

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der  
Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz  
Abteilung für Experimentelle Virologie

Autoradiographische Untersuchungen über die Syn-  
these des Herpes simplex Virus in Makrophagen,  
Kaninchennieren- und BHK-Zellen durch Markierung  
mit  $^3\text{H}$ -Thymidin,  $^3\text{H}$ -Uridin und UDP- $^3\text{H}$ -Galaktose

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin  
der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz  
den Medizinischen Fachbereichen vorgelegt

von  
Jürgen Lindermann  
aus  
Wiesbaden

Mainz 1979

---







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der  
Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz  
Abteilung für Experimentelle Virologie

Autoradiographische Untersuchungen über die Synthese des Herpes simplex Virus in Makrophagen, Kaninchennieren- und BHK-Zellen durch Markierung mit  $^3\text{H}$ -Thymin,  $^3\text{H}$ -Uridin und UDP- $^3\text{H}$ -Galaktose

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin  
der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz  
den Medizinischen Fachbereichen vorgelegt

von  
Jürgen Lindermann  
aus  
Wiesbaden

Mainz 1979

Fachbereichsdekan : Prof.Dr. G.Mann

1.Gutachter : Prof.Dr. D.Falke

2.Gutachter : Prof.Dr. U.Hadding



Meinen Eltern  
und  
meiner Frau



## Abkürzungen

|             |   |                             |
|-------------|---|-----------------------------|
| Std.        | = | Stunde                      |
| p.i.        | = | post infectionem            |
| i.p.        | = | intra peritoneal            |
| s.d.a.      | = | siehe dazu auch             |
| z.n. Quelle | = | zitiert nach Quelle         |
| HSV         | = | Herpes simplex Virus        |
| Min.        | = | Minute                      |
| SK          | = | Silberkörner                |
| KAN-Zellen  | = | Kaninchennieren-Zellen      |
| BHK-Zellen  | = | Baby-hamster-kindney-Zellen |



I. Theoretische Erläuterungen zur Autoradiographie

|                                                                      |   |
|----------------------------------------------------------------------|---|
| I.1. Was ist Autoradiographie ? .....                                | 1 |
| I.2. Das autoradiographische Prinzip.....                            | 1 |
| I.3. Die Expositionszeit .....                                       | 3 |
| I.4. Die Entwicklung .....                                           | 3 |
| I.5. Die Fixierung .....                                             | 4 |
| I.6. Autoradiographische Verfahren und Anwendungsmöglichkeiten ..... | 5 |
| I.6.1. Ganztier/Ganzpflanzenautoradiographie .....                   | 5 |
| I.6.2. Die Lichtmikroskopische Autoradiographie .....                | 5 |
| I.6.3. Die Elektronenmikroskopische Autoradiographie .....           | 5 |
| I.6.4. Die Gel-Autoradiographie und Gel-Fluoroautoradiographie ..... | 6 |

II. Materialien und Methoden

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| II.1. Das Stripping-Verfahren mit AR 10 Stripping-Film bei der autoradiographischen Untersuchung von Deckglaskulturen ..... | 7  |
| II.1.1. Materialien .....                                                                                                   | 7  |
| II.1.2. Der autoradiographische Arbeitsgang .....                                                                           | 7  |
| II.1.3. Färbung der Autoradiogramme .....                                                                                   | 11 |
| II.2. Leighton-Röhrchen und Zellaussaat.....                                                                                | 14 |
| II.3. Zellen.....                                                                                                           | 14 |
| II.3.1. Makrophagen .....                                                                                                   | 14 |
| II.3.2. BHK-Zellen .....                                                                                                    | 16 |
| II.3.3. KAN-Zellen .....                                                                                                    | 16 |
| II.4. Kultur- und Inkubationsmedien .....                                                                                   | 16 |
| II.4.1. Bestandteile .....                                                                                                  | 16 |
| II.4.2. Medien bei den Untersuchungen über den Einbau von $^3\text{H}$ -Thymidin und $^3\text{H}$ -Uridin .....             | 16 |
| II.4.2.1. Kulturmedien .....                                                                                                | 16 |
| II.4.2.2. Inkubationsmedien .....                                                                                           | 16 |
| II.4.3. Medien bei den Untersuchungen über den Einbau von UDP- $^3\text{H}$ -Galaktose .....                                | 17 |
| II.4.3.1. Kulturmedien .....                                                                                                | 17 |
| II.4.3.2. Inkubationsmedien .....                                                                                           | 17 |

|                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| II.5. Viren .....                                                                                                                                                                                                                     | 17 |
| II.6. Titration/Bestimmung der Infektiosität.....                                                                                                                                                                                     | 18 |
| II.7. Infektion der Zellen.....                                                                                                                                                                                                       | 18 |
| II.7.1. Die Infektion mit HSV bei den Untersuchungen<br>über den Einbau von $^3\text{H}$ -Thymidin und $^3\text{H}$ -Uridin                                                                                                           | 18 |
| II.7.2. Die Infektion mit HSV bei den Untersuchungen<br>über den Einbau von UDP- $^3\text{H}$ -Galaktose                                                                                                                              | 19 |
| II.8. Die Markierung mit Isotopen und die autoradiographische<br>Weiterverarbeitung.....                                                                                                                                              | 19 |
| II.8.1. Untersuchungen über den Einbau von $^3\text{H}$ -Thymidin<br>und $^3\text{H}$ -Uridin                                                                                                                                         | 19 |
| II.8.2. Untersuchungen über den Einbau von UDP- $^3\text{H}$ -<br>Galaktose                                                                                                                                                           | 21 |
| II.9. Die Bestimmung der durchschnittlichen Zellzahl.....                                                                                                                                                                             | 22 |
| II.10. Die Auswertung der gewonnenen Autoradiogramme .....                                                                                                                                                                            | 23 |
| <br>III. <u>Autoradiographische Untersuchungen über den Einbau<br/>von <math>^3\text{H}</math>-Thymidin und <math>^3\text{H}</math>-Uridin in nicht infizierte<br/>und mit Herpes-Virus infizierte Makrophagen und<br/>BHK-Zellen</u> |    |
| III.1. Biochemische Aspekte der HSV-Reduplikation .....                                                                                                                                                                               | 24 |
| III.2. Makrophagen .....                                                                                                                                                                                                              | 31 |
| III.2.1. Makrophagen-Definition, Vorkommen und<br>Bedeutung                                                                                                                                                                           | 31 |
| III.2.2. Die Bedeutung der Makrophagen bei der<br>HSV-Infektion der Maus                                                                                                                                                              | 33 |
| III.2.3. Peritoneal-Makrophagen als Kulturzellen                                                                                                                                                                                      | 34 |
| III.2.4. Aktivierter Makrophagen                                                                                                                                                                                                      | 36 |
| III.2.5. Aktivierung mit Thioglykollat und In-<br>fektion mit HSV                                                                                                                                                                     | 37 |
| III.3. Aufgaben und Ziel.....                                                                                                                                                                                                         | 38 |
| III.4. Ergebnisse .....                                                                                                                                                                                                               | 40 |
| III.4.1. Der Einbau von $^3\text{H}$ -Thymidin in Makro-<br>phagen aus NMRI- und C 57/bl-Mäusen                                                                                                                                       | 40 |
| III.4.1.1. Pulsdauer und der Einbau von<br>$^3\text{H}$ -Thymidin                                                                                                                                                                     | 40 |

|              |                                                                                                                                         |     |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| III.4.1.2.   | Markierung durch $^3\text{H}$ -Thymidin<br>in normalen nicht infizierten<br>und mit HSV infizierten NMRI-<br>Makrophagen                | 41  |
| III.4.1.2.1. | Kontrollen                                                                                                                              | 41  |
| III.4.1.2.2. | Lennette und D-316<br>infizierte Makrophagen                                                                                            | 43  |
| III.4.1.3.   | Markierung durch $^3\text{H}$ -Thymidin<br>in aktivierten nicht infizierten<br>und mit HSV infizierten Makro-<br>phagen aus NMRI-Mäusen | 61  |
| III.4.1.3.1. | Kontrollen                                                                                                                              | 61  |
| III.4.1.3.2. | Lennette und D-316<br>infizierte aktivierte<br>Makrophagen                                                                              | 69  |
| III.4.2.     | Markierung durch $^3\text{H}$ -Thymidin in nicht<br>infizierten und mit HSV infizierten<br>BHK-Zellen                                   | 87  |
| III.4.2.1.   | Kontrollen                                                                                                                              | 87  |
| III.4.2.2.   | Lennette und D-316 infizierte<br>BHK-Zellen                                                                                             | 91  |
| III.4.3.     | Markierung durch $^3\text{H}$ -Uridin in nicht<br>infizierten und mit HSV infizierten<br>Makrophagen aus NMRI-Mäusen                    | 94  |
| III.4.3.1.   | Markierung durch $^3\text{H}$ -Uridin in<br>normalen nicht infizierten und<br>mit HSV infizierten NMRI-Makro-<br>phagen                 | 94  |
| III.4.3.1.1. | Kontrollen                                                                                                                              | 94  |
| III.4.3.1.2. | Lennette und D-316<br>infizierte                                                                                                        | 104 |
| III.4.3.2.   | Markierung durch $^3\text{H}$ -Uridin in<br>aktivierten nicht infizierten<br>und mit HSV infizierten NMRI-<br>Makrophagen               | 101 |

|                                                                                                                                                                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| III.4.3.2.1. Kontrollen                                                                                                                                                                                           | 101 |
| III.4.3.2.2. Lennette und D-316<br>infizierte                                                                                                                                                                     | 102 |
| III.5. Diskussion .....                                                                                                                                                                                           | 104 |
| III.5.1. Ist die Mäch $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen auftretende<br>Kernmarkierung in mit HSV infizierten Zellen<br>Ausdruck viraler oder zellulärer DNA-Pro-<br>duktion ?                                         | 104 |
| III.5.2. Zum Problem der cytoplasmatischen Markierung<br>über NMRI-Makrophagen und BHK-Zellen nach<br>$^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen                                                                               | 109 |
| III.5.3. Die DNA- und RNA-Synthese in nicht infi-<br>zierten und mit HSV infizierten normalen<br>und aktivierten Makrophagen                                                                                      | 117 |
| III.5.3.1. Die DNA- und RNA-Synthese in nicht<br>infizierten normalen und aktivierten<br>Makrophagen                                                                                                              | 117 |
| III.5.3.2. Die DNA- und RNA-Synthese in mit<br>HSV-Lennette und HSV-D-316 infi-<br>zierten normalen und aktivierten<br>Makrophagen                                                                                | 123 |
| IV. <u>Autoradiographische Untersuchungen über den Einbau<br/>von UDP-<math>^3\text{H}</math>-Galaktose in BHK- und Kaninchennierzellen<br/>als Nachweis von oberflächengebundenen Glykosyltrans-<br/>ferasen</u> |     |
| IV.1. Was sind Glykosyltransferasen ? .....                                                                                                                                                                       | 132 |
| IV.2. Aufgabe und Ziel .....                                                                                                                                                                                      | 134 |
| IV.3. Ergebnisse .....                                                                                                                                                                                            | 135 |
| IV.3.1. Markierung durch $^3\text{H}$ -Galaktose in Inkubations-<br>medien mit und ohne Überschuß an kalter Galaktose                                                                                             | 135 |
| IV.3.2. Markierung durch UDP- $^3\text{H}$ -Galaktose in Inku-<br>bationsmedien mit und ohne Überschuß an kalter<br>Galaktose                                                                                     |     |

|                                                                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| IV.4. Diskussion.....                                                                                                     | 144 |
| IV.4.1. Die Markierung durch $^3\text{H}$ -Galaktose in Inkubationsmedien ohne und mit Überschuß an kalter Galaktose      | 144 |
| IV.4.2. Die Markierung durch UDP- $^3\text{H}$ -Galaktose in Inkubationsmedien mit und ohne Überschuß an kalter Galaktose | 145 |
| V. Zusammenfassung                                                                                                        | 149 |
| VI. Literaturverzeichnis                                                                                                  |     |
| VII. Lebenslauf                                                                                                           |     |



## I. THEORETISCHE ERLÄUTERUNGEN ZUR AUTORADIOGRAPHIE

### I.1. WAS IST AUTORADIOGRAPHIE ?

Unter Autoradiographie versteht man den Nachweis von radioaktiver Strahlung mit Hilfe einer photographischen Schicht (3).

Die durch die radioaktive Strahlung auf einer photographischen Schicht erzeugten Abbildungen nennt man Autoradiogramme (3).

### I.2. DAS AUTORADIOGRAPHISCHE PRINZIP

In der Autoradiographie macht man sich, wie in der normalen Lichtphotographie, den 'photographischen Prozeß' zunutze (8). Zugeführte Energie erzeugt dabei aus in Silberhalogenidkristallen vorliegendem ionalem Silber metallisches Silber. Die so entstandenen Ag-Atome bilden das 'Latenzbild' (3). Durch den Prozeß der 'Entwicklung' (s.d.a. I.4.) wird die Menge des metallischen Silbers dann so vermehrt, daß ein sichtbares Silberkorn oder ein sichtbarer Silberfaden entsteht (3,52). Das 'Latenzbild' wird zum 'reellen', sichtbaren Bild (3) .

In der normalen Lichtphotographie wird die zur Erzeugung des metallischen Silbers notwendige Energie in Form von Licht zugeführt. Die in einer Photoemulsion verteilten Silberhalogenidkristalle werden 'belichtet'. Die Autoradiographie macht sich zunutze, daß auch radioaktive Strahlung aus Silberhalogenidkristallen metallisches Silber erzeugen kann (3). Die in einer Photoemulsion verteilten Silberhalogenidkristalle werden radioaktiver Strahlung 'exponiert', wobei das entstandene Silber dann die Anwesenheit einer Strahlungsquelle anzeigt (3).

Als Strahlungsquellen kommen in der Autoradiographie radioaktive Isotope bestimmter Elemente zur Anwendung, z.B. das  $\beta$ -Strahlen emittierende Tritium ( $=^3\text{H}$ ) (3).

Enthalten die Moleküle einer Substanz, z.B. eines Zuckers, ein radioaktives Isotop, so wird diese Substanz durch die integrierte Strahlungsquelle 'markiert' .

Sie wird autoradiographisch nachweisbar.

Wichtig dabei ist, daß so markierte Substanzen auch dann noch autoradiographisch nachweisbar bleiben, wenn sie in größeren Strukturen, z.B. in bestimmten Makromolekülen einer Zelle eingebaut sind (87) .

Dabei ist es z.T. möglich, die eingebaute Radioaktivität ohne Zerstörung der sie umgebenden Strukturen nachzuweisen (3,5,87) . Eine Lokalisation und Zuordnung der eingebauten Strahlungsquelle zu den sie umgebenden Strukturen wird dadurch in gewissem Rahmen möglich (87) .

Sind mit radioaktiven Isotopen markierte Moleküle wiederum Bausteine anderer, komplexerer Substanzen, so werden diese Substanzen durch den Einbau des strahlenden Bausteins autoradiographisch nachweisbar (3,87) . Die radioaktiven Bausteine werden hier als 'Marker' oder 'Prekursor' bezeichnet (3,87) .

Prozesse, in denen solche radioaktiven Bausteine in komplexere Substanzen eingebaut werden oder in denen mit solchen Bausteinen markierte Substanzen abgebaut werden, lassen sich so autoradiographisch verfolgen. Markierte Produkte bzw. deren Fehlen wird nachgewiesen.

Ist ein bestimmter Prekursor nur oder überwiegend Baustein einer bestimmten Substanz oder Stoffgruppe, dann wird diese Substanz oder Stoffgruppe durch den Einbau 'spezifisch' markiert (3,87) .

Nachweisbare eingebaute Radioaktivität deutet dann darauf hin, daß nach Zugabe des Prekursors eine Synthese der entsprechenden Substanz oder Stoffgruppe stattfand (3,87) .  
Z.B. wird einer Zellkultur zugeführtes Thymidin fast

ausschließlich in die DNA der Zellen eingebaut (3,18).

$^3\text{H}$ -Thyminid als Prekursor führt dann zu einer 'spezi-fischen' Markierung der Makrostruktur 'DNA'.

Vorhandene Radioaktivität nach Entfernung von nicht eingebautem Prekursor weist dann darauf hin, daß nach Zugabe des  $^3$ -Thymins DNA-Synthese erfolgte (87) . . .

### I.3. DIE EXPOSITIONSZEIT

In der Autoradiographie bezeichnet man als 'Expositionszeit' denjenigen Zeitraum, in dem die in einem Präparat vorhandene Radioaktivität auf die Photoemulsion einwirken und in ihr die oben beschriebenen 'Latenzbilder' erzeugen kann.

Die Exposition von Präparaten sollte unter Standardbedingungen erfolgen, da

1. die Silberkorndichte mit steigender Expositionszeit ansteigt (56)
2. sonstige Faktoren, wie Umgebungstemperatur und Luftfeuchtigkeit, den 'Background' in der Photoemulsion beeinflussen (3).

(Unter Background versteht man dabei die Entstehung von Latenzbildern in nicht von radioaktiver Strahlung getroffenen Silberhalogenidkristallen (3) )

### I.4. DIE ENTWICKLUNG

Unter Entwicklung versteht man die Überführung des Latenzbildes in ein reelles Bild (3). Das durch die Einwirkung von radioaktiver Strahlung primär entstandene metallische Silber wird bis zur Sichtbarkeit vermehrt (3,52).

In der lichtmikroskopischen Autoradiographie (s.d.a.

I.6.2.) kommt die chemische Entwicklung zur Anwendung (3). Unter Katalyse des im Silberhalogenidkristall vorliegendem metallischen Silbers und durch reduzierende Substanzen, wie Hydrochinon oder Pyrogallol, entsteht

weiteres metallisches Silber (52). Dieses erscheint dann bei ausreichender Menge als Silberkorn oder Silberfaden.

Die Größe des entstehenden Silberkorns wird dabei durch verschiedene Faktoren, wie Korngröße der Photoemulsion, Entwicklungsdauer, Temperatur des Entwicklers, Konzentration des Entwicklers, Zusammensetzung des Entwicklers und auch durch die Bewegung der Photoemulsion während der Entwicklung beeinflusst (3).

Die Entwicklungsdauer wirkt sich auch auf die Zahl der entstehenden Silberkörner aus (3). Dabei steigt mit zunehmender Entwicklungsdauer auch die Zahl der Umwandlungen von nicht durch radioaktive Strahlung getroffenen Silberhalogenidkristallen in sichtbare Silberkörner (3).

Neben der chemischen Entwicklung spielen in der elektronenmikroskopischen Autoradiographie auch die 'physikalische Entwicklung' und die 'Kompaktentwicklung' eine Rolle (3, 36, 57).

#### I.5. DIE FIXIERUNG

Ziel des Fixiervorganges ist die Herauslösung nicht von radioaktiver Strahlung getroffener Silberhalogenidkristalle aus der Photoemulsion (3, 52).

Hierzu wird eine 20-30 % Natrium-Thiosulfatlösung verwendet (3). Die nicht getroffenen und nicht entwickelten Silberhalogenidkristalle werden während des Fixiervorganges unter Bildung von Natriumbromid- und Silberthiosulfatkomplexen in der Fixierflüssigkeit gelöst (52).

Die Fixierung beeinflussende Faktoren sind Art und Konzentration des Fixiermittels, Temperatur, Fixierdauer und auch die Bewegung der Photoemulsion in der Fixierflüssigkeit (3).

Wegen des hohen Gehalts an Silberhalogenidkristallen

verbrauchen sich die Fixierflüssigkeiten bei ihrer Anwendung in der Autoradiographie relativ schnell (3,82 Ergebnis eigener Untersuchungen).

## I.6. AUTORADIOGRAPHISCHE VERFAHREN UND ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN

### I.6.1. GANZTIER-/GANZPFLANZENAUTORADIOGRAPHIE

Die Ganztier- bzw. Ganzpflanzenautoradiographie dient der Untersuchung der Verteilung von Substanzen innerhalb der Makrostrukturen von Tier oder Pflanze (3). Die Ganztierautoradiographie hat dabei hauptsächlich die Untersuchung der Verteilung und Aufnahme von Pharmaka und deren Metabolite im Tier zum Inhalt (3).

### I.6.2. DIE LICHTMIKROSKOPISCHE AUTORADIOGRAPHIE

Mit Hilfe der lichtmikroskopischen Autoradiographie läßt sich der Einbau radioaktiv markierter Substanzen in Gewebe, Zellen und auch Makromoleküle verfolgen (3, 72, 87).

Als Untersuchungsmaterialien dienen histologische und cytologische Präparate.

Grundsätzlich stehen zwei Verfahren zur Verfügung:

1. das Stripping-Verfahren
2. das Dipping-Verfahren

Das Prinzip des Stripping-Verfahrens besteht darin, daß ein vorbereitetes Präparat mit einem Filmstück belegt wird (s.d.a.II.1.).

Beim Dipping wird das Präparat in eine flüssige Photoemulsion, die aus einer Gelatinegrundmasse mit eingelagerten Silbersalzkristallen besteht, eingetaucht und so mit der Photoemulsion beschichtet (3).

### I.6.3. DIE ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUTORADIOGRAPHIE

Die elektronenmikroskopische Autoradiographie ist ein

weiteres autoradiographisches Verfahren, das bei Berücksichtigung verschiedener Faktoren biochemische Befunde in Hinblick auf deren Lokalisation und Zuordnung zu bestimmten Zellkompartimenten ergänzen kann (3). Die Handhabung ist außerordentlich diffizil (3).

#### I.6.4. DIE GEL-AUTORADIOGRAPHIE UND GEL-FLUOROAUTORADIOGRAPHIE

Das Ziel der Gel-Autoradiographie besteht darin, im Gel vorhandene, radioaktiv strahlende Substanzen sichtbar zu machen, eingeschlossen solche, deren im Gel vorhandene Menge der üblichen Sichtbarmachung durch Anfärbung nicht zugänglich ist.

Sowohl Slab-Gele als auch Disc-Elektrophoresen können autoradiographiert werden (14,29). Als Filmmaterial kommen dabei meist grobkörnige Röntgenfilme mit großer Empfindlichkeit zum Einsatz (14).

Substanzen, die mit relativ energiereicher Strahlung emittierenden Isotopen z.B.  $^{14}\text{C}$ -markiert sind, lassen sich so relativ einfach nachweisen (14).

Schwierigkeiten bereitet aber der Nachweis von z.B. mit  $^3\text{H}$ -markierten Proteinen auf Grund der geringen Strahlungsenergie dieses Isotops (14).

In diesen Fällen bietet sich die von Bonner und Lasky (14) beschriebene 'Fluorautoradiographie' an. Die von einem Isotop emittierte Strahlung wird dabei durch eine Art nachträglich in das Gel eingebauten Szintillator verstärkt, wobei die vom Isotop emittierte  $\beta$ -Strahlung in Lichtenergiequanten umgewandelt wird, die dann einen Film entsprechend schwärzen (14).

## II. MATERIALIEN UND METHODEN

### II.1. DAS STRIPPING-VERFAHREN MIT AR 10 STRIPPING-FILM BEI DER AUTORADIOGRAPHISCHEN UNTERSUCHUNG VON DECKGLASKULTUREN

#### II.1.1. MATERIALIEN

Bei den vorliegenden autoradiographischen Untersuchungen an Deckglaskulturen kam das Stripping-Film-Verfahren mit dem Stripping-Film AR 10 der Firma Kodak zur Anwendung.  
Daten zum AR 10:mittlerer Korndurchmesser 0.2  $\mu\text{m}$ ; Dicke der Gelatinesupportschicht 10.0  $\mu\text{m}$ ; Dicke der Emulsionsschicht 5.0  $\mu\text{m}$  (55,3).

Als Filmklebstoff wurde Chromalaungelatine verwandt: 2.5 g weiße Gelatine und 0.25 g Chromalaun werden in Wasser von 37°C getrennt gelöst; die Lösungen werden dann gemischt und mit Aqua dest. bis 500 ml aufgefüllt.

Zur Entwicklung wurde D-19-Entwickler der Firma Kodak verwandt. Fixiert wurde mit Kodak-Unifix-Pulver.

Die Photographien wurden mit Kodachrome-II-Diafilm (17 DIN) aufgenommen.

#### II.1.2. DER AUTORADIOGRAPHISCHE ARBEITSGANG

Nach Fixierung (s.d.a.II.8) der sich auf Deckgläschen von 30 x 10 mm befindlichen Zellen wurde wie folgt verfahren, wobei 1. bis 6. bei Tageslicht und 7. bis 18. bei Dunkelkammerbeleuchtung mit einem Wratten-Filter No 1 red der Firma Kodak durchgeführt wurden:

1. Aufziehen der Deckgläschen auf Objektträger mit Eukitt
2. Auswaschen des säurelöslichen Markeranteils in 1% bzw. 2% TCA (s.d.u.II.8.) auf einem Schaukelbrett im Eisbad
3. Abspülen der Präparate mit Aqua dest.
4. Trocknen der Präparate im Trockenschrank bei 37°C für 24 Std.

5. Behandlung der Präparate mit Chromalaungelatine  
Dazu werden die Objektträger mit den darauf befindlichen Deckgläschen einmal in Chromalaungelatine von 30°C eingetaucht.  
Die Chromalaungelatine soll eine gute Haftung des Films während allen folgenden, zum Teil in flüssigem Medium durchzuführenden Arbeitsschritten gewährleisten. Die auf dem Präparat nach dem Eintauchen zurückbleibende Chromalaungelatineschicht hat keinen wesentlichen Einfluß auf die durchtretende  $\beta$ -Strahlung (3) .
6. Trocknen der Präparate im Trockenschrank bei 37°C für 24 Std.

Die folgenden Arbeiten (7.-19.) wurden in der Dunkelkammer durchgeführt. Zur Vermeidung von Background sollte man dabei auf folgendes achten:

- a. völlige Dunkelheit
  - b. keine laufenden Elektromotoren in der Dunkelkammer
  - c. es sollte zur Vermeidung und Verminderung der elektrostatischen Elektrizität für 50-60 % Luftfeuchtigkeit gesorgt werden
  - d. eine Eigenaufladung ist zu vermeiden; daran ist besonders bei Kunststofffußböden zu denken; das Tragen von Schuhen mit Ledersohlen kann hier dienlich sein
7. Entnahme des Films aus dem Kühlschrank, in dem die Lagerung zur Verminderung von Background bei 4°C bis zur Verarbeitung erfolgt (3), und ausreichende Temperaturadaption des Filmmaterials an die herrschende Dunkelkammertemperatur, die bei 18-22 °C liegen sollte (3) .
  8. Entnahme einer die Photoemulsion tragenden Glasplatte aus der Filmpackung und Schneiden von 36 x 50 mm großen Filmstreifen mit einem geerdeten Schneidegerät. Die Filmstreifen werden dabei nicht von der Glasplatte gelöst.

9. Überführen der noch auf der Glasplatte haftenden Filmstreifen in ein Aqua dest.-Bad (Wannengröße: 50 x 30 x 5 cm; Wasserhöhe 3-4 cm; Wassertemperatur um 20°C ) ohne vorherige Lösung von der Glasplatte. Die Glasplatte wird dabei so in das Wasserbad gelegt, daß die die Photoemulsionsschicht tragende Seite nach oben liegt.

10. Quellenlassen der Photoemulsion für 2-3 Min.

11. Belegen der Präparate mit Stripping-Film

Dazu wird jeweils einer der vorgeschnittenen Filmstreifen mit einer Briefmarkenpinzette zu 3/4 von der Glasplatte abgelöst. Der abgelöste Filmstreifen teil 'schwebt' dann im Wasser, wobei dieses 'Schweben' durch leichte Bewegung des Wassers unterstützt werden kann.

Der schwebende Filmteil wird dann mit dem Objektträger so unterfahren, daß die das Deckgläschen tragende Seite des Objektträgers nach oben weist. Anschließend wird der Objektträger schräg nach oben weggezogen und aus dem Wasserbad herausgenommen. Die Enden des Filmstreifens schlagen dabei auf die Rückseite des Objektträgers um, was dem Film während den zukünftigen Arbeitsschritten einen zusätzlichen Halt verleiht.

Als Resultat liegt der Filmstreifen dem Präparat mit der Emulsionsschicht an. Die Gelatinesupportschicht liegt 'nach außen' .

12. Die mit Film belegten Präparate werden anschließend in einem Ständer stehend für 90-120 Min. getrocknet, da zu große Feuchtigkeit des Films während der Exposition den Background erhöhen kann (3).

13. Überbringen der Präparate in schwarze Expositionsböden aus Kunststoff

Je 25 Präparate werden dabei in einem Trägerschrank

in eine Box verbracht. Von Vorteil ist dabei, daß die Präparate auch während der Entwicklung und Fixierung in diesen Gestellen verbleiben können.

Danach werden die Expositionsboxen mit einem Deckel, an dessen Innenseite  $\text{CaCl}_2$  in größerer Menge als Trocknungsmittel angebracht worden ist, verschlossen. Das  $\text{CaCl}_2$  soll durch Verminderung der Luftfeuchtigkeit in der Box während der Exposition die Entstehung von Background erschweren (3).

14. Exposition im Kühlschrank bei  $4^\circ\text{C}$

Für die Dauer der Exposition werden die Plastikboxen zum Schutz vor Umgebungsstrahlung in Stahlkästen, die ebenfalls  $\text{CaCl}_2$  enthalten, eingelagert.

15. Entwicklung

Nach der abgelaufenen Expositionszeit (s.d.a. II.8.) werden die in den Stahlkästen befindlichen Plastikboxen, die Entwicklerflüssigkeit und die Fixierflüssigkeit in einem Wasserbad auf  $18^\circ\text{C}$  gebracht.

Die in den Trägeregestellen belassenen Präparate werden dann nach ihrer Entnahme aus den Expositionsboxen durch 5-minütiges Eintauchen in Kodak-D-19-Entwickler entwickelt. Die Entwicklungsdauer wird dabei mit der Stoppuhr sekundengenau gemessen.

16. Wässerung für 10 Sek. in Aqua dest.

17. 40 Sek. 'Unterbrechung' in 1% Essigsäure

Die 'Unterbrechung' oder das 'Stoppbad' dient der Entfernung von überschüssigem Entwickler aus der Photoemulsion und der Unterbrechung des Entwicklungsprozesses (3). Die Bildung kleiner Bläschen durch teilweise Ablösung des Films, deren Ursache nach Boyd (15) in der Verwendung eines sauren Stoppbades zu suchen ist, wurde nur selten beobachtet.

18. 10 Sek. Wässerung in Aqua dest.

19. Fixierung durch Eintauchen der Präparate in Kodak-Unifix-Lösung für 15 Min.

20. Abschließende Wässerung der Präparate für 5 Min.  
unter fließendem Leitungswasser
21. Trocknung der Präparate für ca 48 Std. im Trockenschrank bei 37° C
22. Färbung der Präparate (s.d.a. II.1.3.)

### II.1.3. FÄRBUNG DER AUTORADIOGRAMME

Für die Auswertung von cytologischen Autoradiogrammen müssen die Zellen durch Anfärbung sichtbar gemacht werden.

Prinzipiell können die Zellen vor ihrer Belegung mit der autoradiographischen Photoemulsion gefärbt werden (Vorfärbung) (3).

Da es aber zum einen zu Aktivitätsverlusten, das heißt Verlust an radioaktivem Material, während des Färbevorgangs kommen kann (3,56) und zum anderen durch den Färbeprozess Substanzen in das Präparat eingelagert werden können, die während der anschließenden Exposition die Entstehung von Latenzbildern im Sinne von positiver oder negativer Chemographie beeinflussen können (56,15), kam diese Möglichkeit der Zellfärbung nicht in Betracht.

(Unter 'positiver Chemographie' versteht man die Erzeugung von Silberatomen in den Silberhalogenidkristallen der Photoemulsion durch reaktive Gruppen, besonders solchen mit Reduktionsvermögen auf chemischem Wege (3). Unter 'negativer Chemographie' versteht man eine solche Beeinflussung der Photoemulsion, die zur Folge hat, daß in bestimmten, durch 'reaktive Gruppen' beeinflussten Bezirken der Photoemulsion der Durchgang radioaktiver Strahlung nicht mehr registriert wird (3)).

Deshalb wurden die Zellen in allen Fällen erst nach der Belegung mit Film, Exposition, Entwicklung und Fixierung gefärbt. Diese 'Nachfärbung' ist bei quantitativen autoradiographischen Untersuchungen die Methode der Wahl (3).

Die Schwierigkeit bei der Färbung von mit Strippingfilm belegten Zellen besteht auch darin, daß sich die Gelatinesupportschicht des Films fast immer mehr oder weniger mitfärbt, da durch sie bei der Nachfärbung hindurch gefärbt werden muß. Kontrast und Schärfe des mikroskopischen Bilds können darunter leiden.

Da das Färbeverhalten verschiedener Zellarten unterschiedlich ist, sollten Färbemethode und Färbezeiten am besten empirisch auf ihre Anwendbarkeit hin überprüft und gegebenenfalls modifiziert werden.

Folgende Färbungen kamen in den durchgeführten Untersuchungen im Wege der 'Nachfärbung' zur Anwendung:

1. Methylenblaufärbung n. Amlacher (3)  
(mit mäßigem, nicht immer reproduzierbarem Erfolg)
  - a. 2 Std. alkalische Methylenblaulösung n. Löffler
  - b. Abspülen mit Wasser
  - c. Differenzieren mit Methanol
2. Toluidinblaufärbung n. Blümcke und Backman (13)  
(mit mäßigem, nicht immer reproduzierbarem Erfolg)
  - a. 5 Std. in Toluidinblau
  - b. Differenzierung in Methanol
3. Toluidinblaufärbung n. Baserga und Malamud (5)  
(mit mäßigem, nicht immer reproduzierbarem Erfolg)
  - a. 1 Std. Färbung in Toluidinblau ( 0.1 % in Azetatspuffer bei einem pH von 4)
  - b. spülen mit Aqua dest.
4. Giemsa-Färbung n. Gude (43) in modifizierter Form  
(sehr gut für KAN-Zellen; zum Teil aber erschwerte mikroskopische Auswertung, da sich die Zellen tief blau färben und somit der Kontrast zu darüber liegenden schwarzen Silberkörnern vermindert wird)
  - a. Giemsa-Färbung bei pH 4.8 für 45-120 Min.  
(Giemsa-Stammlösung 2.5ml; Methanol 3ml; Aqua dest. 100ml; 0.1m Zitronensäure 11ml; 0.2m Dinatriumphosphat 6ml)
  - b. Spülen mit Aqua dest.

5. Htx-Färbung n. Falke (unveröffentlicht)  
(sehr gut für KAN-, BHK-Zellen und Makrophagen)
  - a. 45 Min. Färbung in filtriertem Htx  
(Htx=Hämatoxilin-Stammlösung)
  - b. kurz differenzieren in HCL-Alkohol
  - c. 30 Min. Wasserbad in fließendem Wasser
  - d. 45 Sek. Eosin
  - e. 30 Sek. trocknen
  - f. 3 mal spülen mit Aqua dest.
6. Htx-Färbung (eigene)  
(sehr gut für KAN-, BHK-Zellen und Makrophagen)
  - a. 45-120 Min. in filtrierter Htx-Lösung
  - b. kurz differenzieren in HCL-Alkohol
  - c. 30 Min. Wasserbad in fließendem Wasser
7. Halbfärbung mit Htx-Lösung und Eosin (eigene)  
(sehr gut für KAN-, BHK-Zellen und Makrophagen)
  - a. 45-120 Min. in filtrierter Htx-Lösung
  - b. kurz differenzieren in HCL-Alkohol
  - c. 30 Min. Wasserbad in fließendem Wasser
  - d. Eintauchen des Präparats bis zur Hälfte in  
Eosin für 45 Sek.  
Dadurch, daß das Präparat nur bis zur Hälfte  
in die Eosin-Lösung eingetaucht wird, entsteht  
in der Übergangszone 'nur Htx-Färbung/Htx-Färbung  
+Eosinfärbung' eine sehr kontrastreiche Färbung  
des Präparats.
  - e. 30 Sek. trocknen
  - f. 3 mal spülen mit Aqua dest.

## II.2. LEIGHTON-RÖHRCHEN UND ZELLAUSSAAT

Alle Zellen wurden in Leighton-Röhrchen ausgesät und kultiviert. Auch während der Infektion und der Inkubation mit Isotopen verblieben die Zellen in den Röhrchen.

Nach der Aussaat sedimentierten die Zellen auf ein in dem reagenzglasähnlichem Glasröhrchen liegendem Deckgläschen vom Format 30 x 10 mm.

Nach Infektion, Markierung und Fixierung wurde das Deckgläschen mit den darauf befindlichen Zellen aus dem Leighton-Röhrchen entfernt und, wie unter II.1. beschrieben, weiter verarbeitet.

Bei den Untersuchungen über den Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin und  $^3\text{H}$ -Uridin in Makrophagen und BHK-Zellen wurden die Zellen so ausgesät, daß man eine Zellkultur mit einzeln liegenden Zellen erhielt.

Bei den Untersuchungen über den Einbau von UDP- $^3\text{H}$ -Galaktose wurden die Zellen so ausgesät und kultiviert, daß die Zelldichte von einzeln liegenden Zellen bis zu konfluierenden Zellen reichte.

## II .3. ZELLEN

### II .3.1. MAKROPHAGEN

Die Makrophagen wurden aus NMRI- und C57/bl-Mäusen gewonnen.

Die NMRI-Mäuse stammen aus eigener Züchtung des Mikrobiologischen Instituts Mainz. Die C57/bl-Mäuse wurden vom Zentralinstitut für Versuchstiere, Hannover, bezogen. Serologische Tests, wie bei Falke (30) beschrieben, zur Feststellung der Anwesenheit von Antikörpern gegen Maus-Hepatitis-Virus und Maus-Adeno-Virus waren negativ. Mit einer Infektion der Versuchstiere durch diese Viren mußte deshalb nicht gerechnet werden.

Ebenso zeigte sich nach Immunsuppression mit Cyclophosphamid kein Auftreten von Läsionen der Leber, welche eine mögliche latente virale Infektion angezeigt hätten (Iemmelers, Mitteilung).

'Junge' Makrophagen wurden aus 4 Wochen alten Tieren

und 'alte' Makrophagen aus 12 Wochen alten Tieren gewonnen.

Zur Zellgewinnung wird nach Tötung der Maus das Abdomen gut mit 70 % Alkohol desinfiziert und das Fell so aufgeschnitten, daß das Peritoneum nicht verletzt wird. Danach werden 3 bis 5 ml eines Lahnmediums mit 10 % Kälberserum unter Zusatz von 5 ml Bicarbonat/l und 5-10 IU Heparin/ml intra peritoneal injiziert, wobei sich die injizierte Menge nach der Größe der Maus richtet. Nach vorsichtiger Massage und einigen Minuten Wartezeit aspiriert man die jetzt mit Peritonealzellen angereicherte Flüssigkeit durch ein kleines vorher im Peritoneum zu schaffendes Loch mit einer 5 ml Pipette. Die Peritonealexsudate von mehreren Mäusen werden gepoolt. Zur Aussaat werden dann je nach Zellgehalt des gepoolten Exsudats 0.75 ml bis 1.5 ml in ein Leighton-Röhrchen verbracht.

Die Exsudatmenge, die dabei pro Leighton-Röhrchen gegeben wird, ergibt sich aus Erfahrungswerten.

Auf Grund der unterschiedlichen Zellzahl pro ml des aus nicht aktivierten und aktivierten Mäusen gewonnenen Peritonealexsudats kommen zur Erreichung einer gleichen Zelldichte auf dem im Leighton-Röhrchen liegenden Deckglas unterschiedliche Exsudatmengen zur Anwendung. Wegen der größeren Zelldichte in aus aktivierten Mäusen gewonnenem Exsudat muß davon regelmäßig eine kleinere Menge pro Leighton-Röhrchen gegeben werden.

Nach der Zellgewinnung werden die Makrophagen für 2 Stunden in einer Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, 3 mal mit Hanks'-Lösung gewaschen und frisches Lahnmedium mit 10% Kälberserum, 5 ml Bicarbonat/l sowie 2 ml Antibiotikallösung/l als Kulturmedium gegeben.

Bis zur weiteren Verarbeitung nach 48 Stunden verbleiben die Makrophagen in diesem Medium.

Vor Versuchsbeginn wird nochmals 2 mal mit Hanks'-Lös-

ung gewaschen und anschließend 1.5 ml des wie oben beschrieben modifizierten Lahnmediums pro Leighton-Röhrchen gegeben.

Zur Gewinnung von 'aktivierten' Makrophagen wurden die Mäuse 72 Stunden vor der Zellentnahme mit 2 ml Thio-glykollat intra peritoneal vorbehandelt.

### III.3.2. BHK-ZELLEN

BHK-Zellen wurden, wie bei Falke (32) beschrieben, gezüchtet und ebenso wie die Makrophagen in Leighton-Röhrchen kultiviert, soweit bei den einzelnen Versuchen nichts anderes beschrieben wird.

### III.3.3. KAN-ZELLEN

Die Kaninchennierenzellen wurden, wie bei Falke und Peterknecht beschrieben (34), gewonnen und gezüchtet.

## III.4. KULTUR- UND INKUBATIONSMEDIEN

### III.4.1. BESTANDTEILE

Die Zusammensetzung des Lahnmediums, des BME-Mediums, der Hanks'-Lösung, des BHK-Mediums, der Antibiotika-Lösung und der Bicarbonat-Lösung wird bei Bittlingmaier (10) und Frank (38) näher beschrieben.

Auf besondere Modifikationen der einzelnen Medien wird unter II.4.2. und II.4.3. gesondert hingewiesen.

### II.4.2. MEDIEN BEI DEN UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINBAU VON $^3\text{H}$ -THYMIDIN UND $^3\text{H}$ -URIDIN

#### II.4.2.1. KULTURMEDIEN

Die Makrophagen und BHK-Zellen wurden bis zu ihrer Verarbeitung in Lahnmedium mit 10 % Kälberserum, 5 ml Bicarbonat-Lösung / 1 und 2 ml Antibiotika-Lösung / 1 kultiviert.

#### II.4.2.2. INKUBATIONSMEDIEN

Die Inkubation mit Isotopen erfolgte ebenfalls in dem

wie unter II.4.2.1. beschriebenen Kulturmedium.

#### II.4.3. MEDIEN BEI DEN UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINBAU VON UDP-<sup>3</sup>H-GALAKTOSE

##### II.4.3.1. KULTURMEDIEN

Alle Zellen wurden bis zur gewünschten Dichte in BHK-Medium kultiviert.

##### II.4.3.2. INKUBATIONSMEDIEN

Alle Zellen wurden 2 Stunden vor Versuchsbeginn 2 mal mit Hanks<sup>1</sup>-Lösung gewaschen.

Danach wurden die Leighton-Röhrchen wie im einzelnen angegeben mit je 1 ml BME-Medium oder 1 ml BME-Medium ohne Glucose beschickt.

Zur Optimierung einer eventuell vorhandenen Hydrolaseaktivität wurde das BME-Medium mit 1 mMol MnCl<sub>2</sub>/l versetzt.

Einem Teil der Zellen wurde zur Vermeidung einer intrazellulären Verarbeitung von durch Hydrolyse aus UDP-<sup>3</sup>H-Galaktose freigesetzter <sup>3</sup>H-Galaktose zusätzlich 1 mMol D-Galaktose (Merck) pro Liter Inkubationsmedium zugesetzt.

#### II.5. VIREN

Bei meinen Untersuchungen kamen als Vertreter für Herpes Viren des Typ I der Stamm Lennette (Len) und als Vertreter für Herpes Viren vom Typ II der Stamm D-316 zur Anwendung.

Herkunft der Stämme und ihre Eigenschaften sind bei Just et al (49) beschrieben.

Die Viren wurden in primären Kaninchennierenzellen gezüchtet und passagiert, wie bei Falke (33) beschrieben. Zur Verhinderung des Wachstums von Mykoplasmen wurden die KAN-Zellen mit Tylosan behandelt.

Für die Infektion wurden die aus der Viruszüchtung resultierenden Suspensionen, die aus Medium, Zelltrümmern

und Viren bestehen, zur Abtrennung der Zelltrümmer zunächst für 5 Sek. ultrabeschallt und in einer gekühlten Zentrifuge für 10 Min. bei 4500 x g zentrifugiert. Anschließend wurde erneut für 5 Sek. ultrabeschallt und nochmals für 10 Min. bei 4500 x g zentrifugiert. Die gepoolten Überstände wurden dann zur Infektion verwandt.

Alle Schritte wurden im Eis-Wasser-Bad bzw. während Kühlung durchgeführt.

## II.6. TITRATION-BESTIMMUNG DER INFEKTIOSITÄT

Zur Bestimmung des Gehalts an infektiösen Teilchen wurden die zur Infektion verwandten, gepoolten, virushaltigen Suspensionen auf primären KAN-Zellen titriert.

Das Material wird dabei in Zehnerschritten verdünnt und auf Rollrandröhrchen gegeben.

Die Zahl der in der Virussuspension enthaltenen, infektiösen Teilchen ergibt sich durch Auszählung der durch den zytopathischen Effekt entstandenen Plaques 48 Std. nach Gabe des Materials auf die Rollrandröhrchen, wie bei Falke (31) beschrieben.

Der so erhaltene Titer gibt dann die Zahl der Viren pro ml verwandter Suspension in 'plaque-forming-units' (pfu) an.

## II.7. INFEKTION DER ZELLEN

### II.7.1. DIE INFEKTION MIT HSV BEI DEN UNTERSUCHUNGEN

#### ÜBER DEN EINBAU VON $^3\text{H}$ -THYMINIDIN UND $^3\text{H}$ -URIDIN

Alle Makrophagen und auch die zum Vergleich untersuchten BHK-Zellen wurden jeweils mit der gleichen Virussuspension zu der gleichen Zeit infiziert, mit dem entsprechenden Isotop markiert und nach Beendigung der jeweiligen Inkubationszeiten fixiert und anschließend gleichzeitig autoradiographiert.

Zur Infektion selbst wurde in sonst mediumfreie Leighton-

Röhrchen je 0.4 ml der-wie unter II.5. beschrieben<sup>1</sup> gewonnenen Virussuspension gegeben und dort für 2 Std. belassen. Danach wurde 2 mal mit Hanks'-Lösung gewaschen und erneut 1.5 ml Lahnmedium mit 10 % Kälberserum, 5 ml Bicarbonat/1 und 2 ml Antibiotika-Lösung/1 pro Leighton-Röhrchen gegeben.

Der Titer sowohl der Lennette-haltigen als auch der D-316-haltigen Virussuspension betrug etwa  $3 \times 10^6$  pfu/ 0.2 ml, sodaß bei einer durchschnittlichen Zellzahl von etwa  $2 \times 10^5$  bis  $3 \times 10^5$  pro Deckgläschen und einem Verhältnis Zellzahl/Zahl der infektiösen Teilchen von etwa 1 zu 10 mit einer Infektion fast aller sich auf dem Deckgläschen befindenden Makrophagen gerechnet werden konnte. (Zur Bestimmung der Zellzahl/Deckgläschen s.u. II.9)

#### II.7.2. DIE INFEKTION MIT HSV BEI DEN UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINBAU VON UDP-<sup>3</sup>H-GALAKTOSE

Ein Teil der Zellen wurde 4 Std. vor der Inkubation mit UDP-<sup>3</sup>H-Galaktose bzw. <sup>3</sup>H-Galaktose mit HSV vom Stamm Lennette infiziert.

Dazu wurden die Zellen nach Entfernung des Kulturmediums 2 mal mit Hanks'-Lösung gewaschen und für 2 Std. mit 0.5 ml der virushaltigen Suspension inkubiert.

Danach wurde erneut 2 mal mit Hanks'-Medium gewaschen und wie zu den übrigen Leighton-Röhrchen entsprechend BME-Medium mit oder ohne Glucose hinzugefügt.

Die Virussuspension enthielt  $15 \times 10^6$  pfu/ml.

#### II.8. DIE MARKIERUNG MIT ISOTOPEN UND DIE AUTORADIO- GRAPHISCHE WEITERVERARBEITUNG

##### II.8.1. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINBAU VON <sup>3</sup>H-THYMIDIN UND <sup>3</sup>H-URIDIN

Folgende Isotope wurden als Prekursoren verwandt:

A. Zum Nachweis der DNA-Synthese:

Methyl-<sup>3</sup>H-Thymidin, spez. Aktivität 18.2 mCi/mmol, bezogen vom Radiochemical Centre, Amersham

B. Zum Nachweis der RNA-Synthese:

(5-<sup>3</sup>H)-Uridin, spez. Aktivität 21 mCi/mg, bezogen vom Radiochemical Centre, Amersham

Davon wurden jeweils 2.5 uCi für verschiedene Zeiträume post infectionem (Pulse von 1 bis 18 Std. Dauer) in die 1.5 ml Kulturmedium enthaltenden Leighton-Röhrchen verbracht.

Nach der Markierungszeit, das heißt der Zeit, in der die radioaktiven Prekursoren im Medium belassen wurden, wurde sofort 2 mal mit Hanks'-Lösung gewaschen und anschließend sofort fixiert.

Makrophagen, die mit <sup>3</sup>H-Thymidin inkubiert worden waren, wurden ebenso wie entsprechende BHK-Zellen mit Carnoy'scher-Lösung fixiert.

Makrophagen und BHK-Zellen, die mit <sup>3</sup>H-Uridin inkubiert worden waren, wurden mit 6 % Formalin-Lösung fixiert, da nach Antoni et al (4) bei Fixierung mit Carnoy'scher-Lösung mit einem Verlust von RNA zu rechnen ist.

Zur Kontrolle wurden nichtinfizierte Makrophagen und BHK-Zellen wie oben beschrieben jeweils gleichzeitig markiert und weiterverarbeitet.

Ebenso wurde gleichzeitig mit HSV infizierte BHK-Zellen behandelt.

Zwischen den einzelnen Arbeitsgängen befanden sich die Zellen im Brutschrank bei 37°C.

Die autoradiographische Weiterverarbeitung der Präparate erfolgte, nachdem die Präparate für 24 Std. im Trockenschrank getrocknet waren, auf Objektträger aufgezogen und zur Entfernung nicht verwerteter, löslicher Prekursoren 2 Std. in eiskalter TCA (2 %) auf dem Schaukelbrett gewaschen und abschließend erneut 24 Std. im Trockenschrank bei 37° C getrocknet worden waren.

Alle Präparate mit  $^3\text{H}$ -Thymidin-Markierung wurden 14 Tage exponiert und dann, wie oben beschrieben, entwickelt.  
Alle Präparate mit  $^3\text{H}$ -Uridin-Markierung wurden 7 Tage exponiert und dann, wie oben beschrieben, entwickelt.  
Alle Makrophagen-Präparate wurden durch Nachfärbung mit Htx n. Falke (s.d.a. II.1.3.) oder mit Halbfärbung (s.d.a. II.1.3.) gefärbt, ebenso wie die entsprechenden BHK-Zellen.

#### II.8.2. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINBAU VON UDP- $^3\text{H}$ -GALAKTOSE

Folgende Isotope wurden als Prekursoren verwandt:

- A. D-1- $^3\text{H}$ -(n)-Galaktose, spez. Aktivität 14.2 Ci/mmol, bezogen von New England Nuclear, Boston, Mass.,
- B. UDP- $^3\text{H}$ -Galaktose (Galaktose-1- $^3\text{H}$ -(n)), spez. Aktivität 0.05 mCi/ 0.0020 mg; bezogen von New England Nuclear, Boston, Mass.

Davon wurden jeweils 1 u Ci bzw. 2 u Ci pro Leighton-Röhrchen gegeben und zwar 2 Std. nachdem die Zellen mit dem entsprechenden Inkubationsmedium beschickt worden waren. Die Pulsdauer beträgt jeweils 3 Std.

Nach Ablauf der 3-stündigen Inkubationszeit wurde 2 mal mit Hanks'-Medium gewaschen und die Zellen anschließend für 10 Min. mit Carnoy'scher-Lösung fixiert.

Nach ihrer Entnahme aus den Leighton-Röhrchen wurden die mit den Zellen bewachsenen Deckgläschen für 24 Std. im Trockenschrank bei einer Temperatur von  $37^{\circ}\text{C}$  getrocknet. Danach wurden sie 2 Std. mit 1 % eiskalter TCA gewaschen und mit Aqua dest. abgespült.

Die Präparate wurden dann, wie oben beschrieben, autoradiographisch weiterverarbeitet.

Die Expositionszeit betrug 2 bzw. 5 Wochen.

Gefärbt wurde mit der Htx-Färbung n. Falke (s.d.a. II.1.3.) sowie den unter II.1.3. beschriebenen Färbungen Nr.6 und Nr.7 .

## II.9. DIE BESTIMMUNG DER DURCHSCHNITTlichen ZELLZAHL

Um eine Aussage über das Verhältnis Zellzahl/Zahl der bei der Infektion applizierten Virusteilchen zu erhalten, wurden drei sehr dicht mit aktivierten Makrophagen bewachsene Deckgläschen auf einer Fläche von 5 x 5 mm ausgezählt und die Gesamtzahl der auf einem Deckgläschen sedimentierten Zellen dann wie folgt berechnet:

| Präparat Nr.             | 1      | 2      | 3      |
|--------------------------|--------|--------|--------|
| Zellzahl auf<br>5 x 5 mm | 16 900 | 19 700 | 19 470 |

Durchschnittliche Zellzahl auf einem Deckglas von  
30 x 10 mm:

$$\frac{16900+19700+19470}{3} \times \frac{30 \times 10 \text{ mm}}{5 \times 5 \text{ mm}} = 221\ 040$$

Damit ergibt sich für die Zahl der sich durchschnittlich auf einem Deckgläschen befindlichen sedimentierten Zellen ein Wert von etwa

$$2 \times 10^5 \quad \text{bis} \quad 3 \times 10^5$$

Selbstverständlich kann ein so gewonnener Durchschnittswert nur ein Anhaltspunkt sein.

Da es sich bei den gezählten Zellen aber um aktivierte Makrophagen handelt, die in der Regel wesentlich dichter auf den Deckgläschen sedimentierten als Makrophagen aus unbehandelten Mäusen, ist der gewonnene Wert eher Ausdruck einer maximalen denn einer minimalen Besiedlung des Deckgläschens.

## II.10. DIE AUSWERTUNG DER GEWONNENEN AUTORADIOGRAMME

Die gewonnenen Autoradiographien wurden zum einen qualitativ und zum anderen durch die Zählung von markierten Zellen auch quantitativ ausgewertet.

Die qualitative Auswertung berücksichtigt, ob überhaupt eine autoradiographisch feststellbare Markierung vorliegt und bezieht die Veränderungen der Zellmorphologie nach der Infektion mit Herpes-Virus mit ein.

Die quantitative Auswertung bestand in der Zählung der markierten und nicht markierten Zellen, wobei die markierten Zellen wie folgt unterteilt wurden:

- a. Zellen mit bis zu 5 Silberkörnern über dem Kern
- b. Zellen mit mehr als 5 Silberkörnern über dem Kern
- c. Zellen mit mehr als 5 Silberkörnern über dem Kern  
und mehr als 5 Silberkörnern über dem Zellcytoplasma

Jeder der in den Histogrammen aufgeführten Werte beruht auf der Zählung von je 500 Zellen in 2 gleichbehandelten Präparaten.

Wiederholte Versuche brachten die gleichen Ergebnisse.

Um den Zellverlust durch 'cytopathischen Effekt' zu erfassen wurden 2 'Blickfelder zweier gleichbehandelter Präparate unter dem 10er Objektiv photographiert, die so erhaltenen Diapositive projiziert und die Zellzahl ausgezählt.

Die durch Mittelwertbildung gewonnene durchschnittliche Zellzahl/pro Blickfeld wurde dann mit der auf gleiche Weise ermittelten Zellzahl in entsprechenden Kontrollpräparaten verglichen, wobei die durchschnittliche Zellzahl/pro Blickfeld der Kontrolle mit 100 % gleichgesetzt wurde.

Mit der gleichen Methode wurde die Veränderung der Zelldichte mit der Zeit in BHK- und Makrophagenkulturen ermittelt.

### III. AUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EIN- BAU VON $^3\text{H}$ -THYMDIN UND $^3\text{H}$ -URIDIN IN NICHT INFI- ZIERTE UND MIT HERPES-VIRUS INFIZIERTE MAKRO- PHAGEN UND BHK-ZELLEN

#### III.1. BIOCHEMISCHE ASPEKTE DER HSV-REDUPLIKATION

Infiziert man Zellen mit Herpes-Viren, können zwei Ergebnisse resultieren.

Zum einen kommt es in vielen mit HSV infizierten Zellen zur Produktion infektiöser Virusteilchen (7,66).

Diesen Typ der zellulären Infektion kann man als 'produktive Infektion' bezeichnen (66).

Zum anderen resultiert aus einer Infektion nicht immer auch gleichzeitig die Bildung infektiöser Partikel: z.T. werden zwar nach Adsorption und Penetration des Virus diese oder jene Viruskomponenten gebildet, zur Produktion von infektiösem Virus kommt es aber nicht (7).

Diesen Typ der Infektion bezeichnet man als 'abortive Infektion' (7,50).

Die Auswirkungen beider Infektionstypen auf den Zellstoffwechsel der infizierten Zellen sind im allgemeinen -auch bei Infektion mit verschiedenen Herpes Viren- qualitativ gleich (7) : Nach der Infektion beobachtet man eine Synthesehemmung der zellspezifischen Makromoleküle, welche mit einer mehr oder minder großen Anhäufung virusspezifischer Komponenten in der Zelle verbunden ist (7) .

#### DIE PRODUKTIVE INFEKTION

Übereinkunftsgemäß wird der virale Vermehrungszyklus in verschiedene Phasen eingeteilt (19 ).

Die erste Phase des Zyklus ist die 'Adsorption' oder

die 'Bindung' des Virus an die Zelle (19 ).Die 'Adsorptions-rate' der Herpes Viren wird dabei von verschiedenen Faktoren, wie der relativen Konzentration des Virus (19),der Anwesenheit von Kationen im Inkubationsmedium (83) ,dem Stoffwechselstadium der Zellen (83) ,der infizierten Zellart (83) und auch von der Art des zur Infektion verwandten Herpes-Virus beeinflusst (19).

Die zweite Phase ist die 'Penetration',d.h. der Eintritt des infektiösen Partikels in die Zelle'(19,83).

Huang und Wagner beobachten,daß bei 37°C über 90 % eines adsorbierten Herpes-Virus innerhalb von 10 Min. in die Zelle eintreten (19,66).Auch andere beobachten,daß die Penetration relativ schnell nach der Virusadsorption erfolgt (83).Als mögliche Mechanismen für diesen Vorgang werden neben einer Verschmelzung der viralen Hülle mit der Plasmamembran (66) auch pinocytoseähnliche Vorgänge für die Penetration verantwortlich gemacht (89,83) .

Nachdem das Virus in die Zelle eingedrungen ist wird im Rahmen des 'Uncoating' seine äußere Hülle durch zellständige lysosomale Enzyme abgebaut ( 7,66,83).Es resultiert eine im Proteinkomplex vorliegende,gegen zelluläre Nukleasen geschützte virale DNA,die im weiteren Zyklusverlauf in den Zellkern transportiert wird (66,83).

Das 'Uncoating' selbst markiert den Beginn einer weiteren Zyklusphase,der 'Eklipse',einer Phase,in der kein infektiöses Virus innerhalb der Zelle zu beobachten ist (66).

Während der Eklipse werden virale RNA (7,66) ,virusspezifische Enzyme (7),virale DNA (7) und virale Strukturproteine synthetisiert (7).

Die Eklipsendauer beträgt für die meisten Herpes-Viren zwischen 3 und 8 Std. (83).Sie wird durch die Inkubationstemperatur (83),die Infektionsmultiplizität (83) und die infizierte Zellart (7) beeinflusst. ,

Nach dem Eintritt der viralen DNA in den Zellkern beginnt die Synthese viraler RNA (66). Dabei werden etwa 50 % der viralen DNA überhaupt transkribiert (66), wobei vor dem Beginn der viralen DNA-Synthese etwa 44 % HSV-DNA bei Infektion mit HSV vom Typ I und etwa 21 % HSV-DNA bei Infektion mit HSV vom Typ II in virusspezifische RNA umgesetzt werden (66).

Flanagan (7) zeigt für mit HSV infizierte KB-Zellen, daß virale RNA schon 3 Std. p.i. nachzuweisen ist. Danach beobachtet er wie andere (7) einen Anstieg der Syntheserate viraler RNA bis zur 7 Std. p.i. .

Nach der 7 Std. p.i. kommt es dann zu einer zunehmenden Verminderung der viralen RNA-Synthese (7).

Die synthetisierte virale m-RNA steuert nach ihrem Einbau in freie und membrangebundene Polyribosomen des Zellcytoplasmas die Synthese von virusspezifischen Struktur- und 'nonstructural' Proteinen (66).

Unter Strukturproteinen versteht man dabei solche Proteine, die im weiteren Verlauf des viralen Vermehrungszyklus Teil des viralen Cores, des Capsid oder der viralen Hülle werden (7) .

Die Funktion der 'nonstructural' Proteine ist bisher nicht sicher geklärt (66). Ihre Beteiligung an der Reduplikation viraler DNA wird vermutet (66). Daneben sind zu diesen 'nonstructural' Proteinen aber auch viruscodierte Enzyme, wie die Thymidin-Kinase (10) und DNA-Polymerase, zu zählen (66,7).

Für mit HSV infizierte HEp-2 Zellen zeigt Roizman et al (83), daß nach einem initialen Abfall der zellulären Proteinsynthese in der 0-3 Std. p.i. von der 3-8 Std. p.i. eine virusinduzierte Steigerung der Proteinsynthese mit einer anschließenden irreversiblen Verminderung erfolgt. Der größte Teil der viruscodierten Proteine wandert nach seiner Synthese im Cytoplasma in den Zellkern (66). Ein kleiner Teil verbleibt im Cytoplasma und wird z.T. an zelluläre Membranen gebunden (66).

Für die Synthese viruscodierter t-RNA liegen bisher keine gesicherten Beweise vor (7,66).

Wie oben beschrieben, beginnt während der Eklipse auch die Reduplikation der viralen DNA.

Zur Initiierung der virusspezifischen DNA-Synthese werden bestimmte Frühproteine, wie z.B. Polymerasen, benötigt (7, 66), die p.i. de novo synthetisiert werden müssen. Ist die virale DNA-Synthese einmal in Gang, so führt die Unterbrechung der Proteinsynthese durch Gabe von Puromycin lediglich zu einer reduzierten DNA-Syntheserate (83,7). Der Beginn der viralen DNA-Synthese ist abhängig vom zur Infektion verwandten Herpes-Virus (7), dem infizierten Zelltyp und der zur Infektion verwandten Infektionsmultiplizität (7).

Für mit HSV infizierte HEp-2 Zellen beobachten Sydiskis und Roizman (83), daß der größte Teil der viralen DNA im Zeitraum 4- Std. p.i. synthetisiert wird. Zwischen der DNA-Reduplikation und der Bildung von infektiösem Virus sollen dabei 6 bis 9 Std. vergehen (83).

Kaplan und Ben-Porat (7) beobachten in mit PRV<sup>x</sup>infizierten Zellen einen Anstieg der viralen DNA-Synthese bis zur 7.5 Std. p.i..

Die HSV-DNA wird semikonservativ redupliziert (7).

In humanen Zellen werden bis zu 120 000 Kopien der viralen DNA hergestellt (66), aber nur etwa 20 % werden davon in die im Zellkern vorliegenden Capside, die durch die einwandernden Strukturproteine gebildet werden (7), als DNA-COR eingebaut (66). Vor ihrem Einbau in die Capside wird die neusynthetisierte virale DNA in eine DNase unempfindliche Form übergeführt, die als Vorläufer des reifen Virus angesehen wird (7).

Neben den Capsiden mit DNA-COR beobachtet man auch solche ohne DNA-COR und Capside, welche von einem amorphen Material umgeben sind und der Kernmembran anhaften (66).

<sup>x</sup>PRV=Pseudo-Rabies-Virus; zu der Gruppe der Herpes-Viren zählendes Virus

Im weiteren Verlauf des Vermehrungszyklus erhalten die durch DNA-Core und Capside gebildeten Nukleocapside ihre Hülle durch 'budding' beim Durchtritt durch die innere Lamelle der Kernmembran in den perinukleären Raum (89, 66,7,83). Die Hülle ist also modifiziertes Kernmembranmaterial, welches keine zellulären Proteine mehr enthalten soll (7,66). Vor allem im späteren Verlauf des Vermehrungszyklus kann man aber auch vor allem in mit HSV des Typ II infizierten Zellen ein 'budding' an cytoplasmatischen Membranen beobachten (66) .

Mit dem ersten intrazellulären Auftreten infektiöser Partikel beginnt eine weitere Phase des Vermehrungszyklus, die 'latente Periode', die mit der Freisetzung des ersten infektiösen Partikels in das Inkubationsmedium endet (19). Diese 'latente Periode' soll für Herpes-Viren mit kurzen Vermehrungszyklus und schneller Virusfreisetzung 1 bis 3 Std. betragen (19), ist aber von der infizierten Zellart und dem zur Infektion verwandten HSV außerordentlich abhängig (19).

Der 'latenten Periode' schließt sich als letzte Phase die 'Periode des exponentiellen Wachstums' an, in der der größte Teil des Virus produziert wird (19).

Der Übergang in eine mehr stationäre Phase mit anschließendem Stillstand der Virusproduktion kennzeichnet das Ende dieser letzten Phase (19).

Powell (19) beobachtet in mit HSV infizierten L-Zellen eine 4 bis 5 Std. dauernde 'Periode des exponentiellen Wachstums'.

Die mit Hülle versehenen Viruspartikel akkumulieren im Raum zwischen der inneren und äußeren Lamelle der Kernmembran und im endoplasmatischen Retikulum (66).

Als Mechanismen der Virusfreisetzung werden folgende Möglichkeiten diskutiert: zum einen soll die Virusfreisetzung durch eine Art umgekehrte Pinocytose zustande kommen (66,7), zum anderen soll in infizierten Zellen das endoplasmatische Retikulum den perinukleären Raum

mit dem extrazellulären Raum verbinden und so eine Virus-freisetzung möglich machen (66).

## DIE AUSWIRKUNGEN DER HSV-REDUPLIKATION AUF DEN STOFFWECHSEL

### DER WIRTSZELLE

Eine produktive Infektion mit Herpes-Virus führt unab-änderlich zu strukturellen und funktionellen Konsequenzen für die Wirtszelle (66).

Schon früh p.i. können zwei, offenbar von der Synthese viraler DNA unabhängige Vorgänge beobachtet werden (66). Einmal kommt es nach der Penetration des Viurs zu einer zunehmenden Verminderung der Syntheserate von zellspe-zifischer DNA und zellspezifischen Proteinen (7,66).

Zum anderen kommt es zu wesentlichen Veränderungen im RNA-Stoffwechsel der Wirtszelle (7,66,83).

Die Verminderung der zellspezifischen DNA- und Protein-syntheserate p.i. geht mit der Kondensation und Verdrängung des Chromatins an die Kernmembran und einem Auseinander-weichen der zellulären Polyribosomen einher (7,66,83).

In der 3 bis 5 Std. p.i. ist die zellspezifische DNA- und Proteinsynthese vollkommen zum Stillstand gekommen (66,83).

Die virusinduzierte Hemmung der zellulären DNA-Synthese wird möglicherweise dadurch bedingt, daß in infizierten Zellen die zelluläre DNA nicht als Matritze für den Re-duplikationsvorgang zur Verfügung steht (7).

Daneben wird diskutiert, daß in infizierten Zellen histon-ähnliche Proteine, die die zelluläre DNA-Synthese hemmen synthetisiert werden (7). oder daß die Synthese von zellulären Proteinen, die zur Reduplikation zellulärer DNA not-wendig sind, in infizierten Zellen unterbrochen ist (7).

Die Hemmung der zellulären Proteinsynthese ist offen-bar durch die Synthese bestimmter Faktoren, welche eine Vereinigung zellulärer m-RNA mit Ribosomen und die Bildung zellspezifischer Polyribosomen verhindern, bedingt (7).

Die Veränderungen im zellspezifischen RNA-Stoffwechsel p.i. zeigen sich vor allem in einer Hemmung der Synthese zellulärer RNA (7,66,83).

Die Hemmung der zellulären RNA-Synthese ist aber unvollständig: selbst in späten Stadien der Infektion kommt es in infizierten Zellen zur Bildung zellspezifischer RNA (7).

Eine weitere Folge der Infektion ist die Hemmung der Metabolisierung noch gebildeter zellspezifischer RNA (7,66).

Ein kleiner Teil der auch p.i. gebildeten zellspezifischen RNA erreicht das Cytoplasma, ohne aber funktionsfähige Komplexe mit den vorhandenen Polyribosomen einzugehen (66).

Die Synthesehemmung selbst betrifft sowohl die zellspezifische r-RNA, m-RNA als auch t-RNA (7) und ist wahrscheinlich durch ein virusinduziertes Protein bedingt (7).

Wie auch die Synthesehemmung der zellulären DNA- und der zellulären Proteine, ist die Hemmung der zellulären RNA-Synthese im wesentlichen in der 3 bis 5 Std. p.i. zu beobachten (83).

Weiter kommt es in mit HSV infizierten Zellen mit zunehmender Dauer p.i. zu einem zunehmenden Verlust von Makromolekülen aus den Zellen (66), der mitverursachend für den am Ende des viralen Vermehrungszyklus stehenden Zelluntergang ist (7).

Die Zellmembran der infizierten Zellen zeigt neue immunologische Determinanten, die mit den auf der Virushülle vorhandenen sehr ähnlich, wenn nicht gar identisch sind (7,66).

Auch kommt es zur Beeinflussung von bestimmten Zellinteraktionen durch die Bindung virusspezifischer Glykoproteine (66).

Am Ende der produktiven Infektion steht der Zelltod (7,66).

### III.2. MAKROPHAGEN

#### III.2.1. MAKROPHAGEN-DEFINITION, VORKOMMEN UND BEDEUTUNG

Im allgemeinen medizinischen Sprachgebrauch ist die Auffassung darüber, was mit dem Begriff 'Makrophage' gemeint ist, keineswegs einheitlich.

Zum Teil werden Makrophagen gleichgesetzt mit 'Klasmatocyten, histiogenen Wanderzellen des Gewebes, ruhenden Wanderzellen, Polyblasten und Adventitiazellen' (81). Andere (39) bezeichnen alle mononucleären Phagozyten als 'Makrophagen', die im Blut als 'Monozyten', im Gewebe als 'Histiozyten', in der Milz, in Lymphknoten und im Knochenmark als 'Retikulumzellen', in der Leber als 'v. Kuppfersche Sternzellen' und im ZNS als 'Mikroglia' bezeichnet werden, wobei alle insgesamt das 'Retikulo-Histocytäre-System' bilden.

Einige (93,96) wiederum bezeichnen nur die im Gewebe vorliegenden mononucleären Phagozyten als 'Makrophagen', während die im Blut vorkommenden als 'Monocyten' bezeichnet werden. Dem Folgenden liegt diese Auffassung über den 'Makrophagen' zugrunde.

Makrophagen kommen grundsätzlich in allen Geweben vor (98).

In ausreichendem Maße lassen sie sich aber nur aus Lungen und Peritoneum gewinnen, weswegen in experimentellen Untersuchungen hauptsächlich Alveolar- und Peritoneal-Makrophagen untersucht werden (98).

Bei nicht vorbehandelten Mäusen sind die Zellen eines durch Peritonealwäsche gewonnenen Exsudats (s.d.a.II.3.1.) überwiegend Lymphozyten (91). Um daraus selektiv Makrophagen zu gewinnen, macht man sich eine Markereigenschaft der Makrophagen, die in ihrer Fähigkeit besteht fest auf Glasflächen zu adhärieren, zunutze (91,96).

Die Bedeutung der Makrophagen liegt in ihrer vielfältigen Beteiligung bei der zellulären und humoralen Abwehr.

So können Makrophagen Mikroorganismen durch Phagozytose und anschließenden intracytoplasmatischen Abbau durch Abgabe von lysosomalen Enzymen an die phagocytären Vakuolen zerstören (39,98) .

Aber nicht alle Mikroorganismen können auf diese Weise durch Makrophagen abgebaut werden.

Listerien, M.tuberculosis, M.leprae und andere, sowie z.B. auch Ectromelia-Virus und Herpes-Virus widerstehen dem intrazellulären Abbau (11,39,44) und können durch die intrazelluläre Lage so vor humoralen Antikörpern geschützt, den Makrophagen als 'Vehikel' benutzend, sich besser im Körper ausbreiten (39).

Neben dieser mehr direkten Wirkung sollen die Makrophagen auch eine Kontrollfunktion in der humoralen und zellulären Abwehr innehaben (98).

Diese soll unter anderem in der Freisetzung von Faktoren bestehen, die eine optimale Immunantwort ermöglichen (98). Offenbar tragen die Makrophagen auch zur Stimulierung der Antikörperproduktion bei, indem sie Antigene 'aufbereiten' und anderen Zellen des Immunsystems - vor allem den T-Lymphozyten - 'präsentieren' (74) .

Auch die Interferonproduktion von Lymphozyten wird durch Makrophagen, die auch selbst zur Interferonproduktion fähig sein sollen (12) , maximiert (25).

Durch Sekretion verschiedener biologisch aktiver Substanzen sind Makrophagen ebenfalls an der Pathogenese der chronischen Entzündung (20) und an der Gewebsregeneration beteiligt (39).

Auf Grund cytotoxischer und cytostatischer Aktivitäten haben sie auch eine Relevanz bezüglich der immunologischen Antwort auf Tumorstadium (53) .

### III.2.2. DIE BEDEUTUNG DER MAKROPHAGEN BEI DER HSV-INFEKTION DER MAUS

Makrophagen sind auch bei viralen Infektionen an der Immunantwort des Organismus beteiligt (12) .

Mims (62) sieht ihre Funktion in der Beeinflussung der Empfänglichkeit für eine virale Infektion und in der Kontrolle der viralen Infektion bestimmter Organe.

Für die Beteiligung der Makrophagen bei der zellulären Immunantwort wurde bei verschiedensten viralen Infektionen Hinweise gefunden, so bei der Infektion mit Pocken-Virus (11), Arena-Virus (48), Varicellen-Virus (2,101) und Cytomegali-Virus (2,101).

Die Beteiligung der Makrophagen an der Infektionsabwehr speziell bei der Infektion mit HSV wurde durch verschiedene Untersuchungen belegt.

So zeigen Zisman et al (102), daß bei Mäusen, welche i.p. mit Anti-Makrophagen-Serum und anderen Makrophagen schädigenden Agenzien vorbehandelt wurden, vermehrt progressive Hepatitiden auftraten. Diese waren offenbar durch den Wegfall funktionstüchtiger Makrophagen bedingt (102).

Auf unterschiedliche Eigenschaften der Makrophagen von Baby- und Erwachsenenmaus wird die höhere Empfänglichkeit der Säuglingsmaus für die Herpesinfektion zurückgeführt (44,46). Dabei spielt einmal die nur bei Makrophagen aus Babymäusen vorhandene Fähigkeit, die Infektion an Nachbarzellen weiterzugeben, eine Rolle (46), zum anderen wahrscheinlich auch die 'Nicht-Stimulierbarkeit' dieser Makrophagen (44).

Durch Transfer adulter Makrophagen auf Babymäuse gelang es, diese weniger empfänglich für Infektionen mit HSV zu machen (102) .

Die Empfänglichkeit und Schwere der Infektion ist aber nicht nur vom Alter der Mäuse abhängig.

So sind Mäuse des Stammes C 57 relativ wenig empfänglich für eine i.p. Infektion mit HSV (58,86) . In den Makrophagen dieser Mäuse wurde auch keine Vermehrung des

HSV festgestellt (86) .

NMRI- und BALB/c-Mäuse sind dagegen für eine i.p. Infektion mit HSV empfänglich (86,63) .Durch Titration auf primären KAN-Zellen (86) bzw. durch 'infectious center assays', in denen Makrophagenkulturen mit primären Mäuseembryonalzellen überschichtet wurden und die Anzahl der entstandenen Plaques das Maß für die Virusvermehrung waren (63),wurde in Makrophagen dieser Mäuse eine Vermehrung von HSV festgestellt.

Neben den genetischen Determinanten des Wirts spielen ebenfalls die genetischen Eigenschaften des infektiösen Partikels in bezug auf den Infektionserfolg eine Rolle. Mogensen (63) beobachtet bei der i.p. Infektion mit HSV Typ II im Vergleich zur i.p. Infektion mit HSV Typ I in Leber und Milz-beides makrophagenreiche Organe-von BALB/c-Mäusen vermehrt Läsionen und Viruspartikel,ebenso wie eine größere Vermehrung von Typ II in Makrophagen in vitro im Vergleich zu Typ I gemessen mit 'infectious center assays'.

Schindling (86) beobachtet dagegen keine Vermehrung von HSV Typ II in NMRI-Makrophagen wohl aber eine geringe Vermehrung von HSV Typ I.

Stevens und Cook (90) zeigten,daß in Makrophagen nach der Infektion mit HSV die Produktion viraler DNA induziert wird,aber nur wenige komplette Viruspartikel aus diesem Prozeß resultieren,wie durchgeführte elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben.

### III.2.3. PERITONEAL-MAKROPHAGEN ALS KULTURZELLEN

Peritoneal-Makrophagen vermehren sich nicht in Kulturmedien,in denen viele andere primäre und sekundäre Zellen eine Vermehrung zeigen (21) .

Van Furth et al (96) beobachteten nur 2.2 % markierte Peritoneal-Makrophagen bei Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin in vitro.Wird nach der Gewinnung zunächst für 24 Std.

in  $^3\text{H}$ -Thymidin freiem Medium inkubiert und erst danach für 24 Std.  $^3\text{H}$ -Thymidin hinzugefügt, ist keine Zellmarkierung festzustellen (96). Auch die Inkubation in  $^3\text{H}$ -Thymidin über 120 Std. ergibt keinen Anstieg der Zahl markierter Makrophagen (96). Wenige Mitosen sind beschrieben (96).

Chang et al (17) beobachten dagegen keine Mitosen in Kulturen aus Peritoneal-Makrophagen.

In von Tewari et al (94) durchgeführten Untersuchungen ergeben sich bei 1 stündigen  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen weniger als 1 % markierte Makrophagen. Ein Anstieg der RNA-Synthese ist dagegen über 24 Std. zu beobachten (94).

Peritoneal-Makrophagen werden deshalb als sich nicht teilende Zellen mit Block in der  $G_0$ -Phase angesehen (40, 94).

Eine Stimulierung des  $^3\text{H}$ -Thymidineinbaus als Ausdruck einer vermehrten DNA-Synthese und einer Vermehrung von Peritoneal-Makrophagen in vitro kann aber unter bestimmten Voraussetzungen erzielt werden, wie Defendi (21) und Stewart (91) gezeigt haben.

Dabei sollen drei Bedingungen zur Erzielung der Replikation von Makrophagen und zur Stimulierung ihrer DNA-Synthese notwendig sein (21):

1. die Anwesenheit eines Makrophagenwachstumsfaktors (MGF), der durch andere Zellen z.B. Lymphozyten produziert wird
2. die Anwesenheit eines oder mehrerer dialysierbarer Serumfaktoren
3. eine 'Aktivierung' der Makrophagen z.B. durch Injektion von Stärke oder Thioglykollat in die Peritonealhöhle 1-3 Tage vor der Makrophagengewinnung.

Defendi (21) beobachtet unter diesen Voraussetzungen einen Anstieg der Zahl markierter Peritoneal-Makrophagen zwischen 40 bis 90 % im Zeitraum von 5 bis 7 Tagen mit

anschließendem Abfall bei Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin und beschreibt, daß eine Markierung in den ersten 24 Std. nach der Zugabe des MGF ausbleibt.

In den Untersuchungen von Stewart et al (91) zeigen sich schon initial 4 % markierte Makrophagen nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin. Hier steigt die Zahl der markierten Makrophagen bis zum 8 Tag auf 34 % (91) .

Da die Anzahl der auftretenden Mitosen geringer ist als die beobachtete Steigerung der DNA-Synthese und viele aktivierte Makrophagen zweikernig werden (21) ,schließt Defendi (21), daß nur eine kleine Gruppe Zellen aus den aktivierten Makrophagenpopulationen vollständige Zellproliferationszyklen durchlaufen kann.

### III.2.4. AKTIVIERTE MAKROPHAGEN

Peritoneal-Makrophagen aus dem Peritonealexsudat von Mäusen, welche intra peritoneal mit 'aktivierenden' Substanzen, wie Stärke oder Thioglykollat, vorbehandelt wurden, bezeichnet man als 'aktivierte' Makrophagen (21) .

Aktiviert Makrophagen unterscheiden sich von normalen Makrophagen sowohl hinsichtlich ihrer Morphologie als auch ihres funktionellen Zustandes.

Sie sind wesentlich größer (24,35), zeigen vermehrt Vakuolen und Filamente (24) und zeichnen sich durch einen höheren Gehalt an Mitochondrien aus (1,9). Daneben zeigen aktivierte Makrophagen im Gegensatz zu normalen wieder einen gut entwickelten Golgi-Apparat und viele cytoplasmatische Polyribosomen (45) .

Funktionell differieren sie gegenüber normalen Makrophagen durch eine erhöhte Phagozytoseaktivität (92), gesteigerter Bakterizidie (92), auch gegenüber intrazellulären Mikroorganismen, wie z.B. *Leishmania enriettii* (61), einer erhöhten cytotoxischen Aktivität gegenüber Tumorzellen (26) und einer gesteigerten Fähigkeit auf Glasflächen zu adhäreren (95).

In der Kultur zeigen aktivierte Makrophagen vermehrt

Kontakt untereinander durch Filopodien (77).

Biochemisch weisen sie neben der Stimulierbarkeit ihrer DNA-Synthese (21,91), eine gesteigerte Stoffwechselrate (45) sowie veränderte Enzymaktivitäten, wie einen vermehrten Gehalt an Amino-peptidase (97) oder Produktion eines Plasminogenaktivators (95) auf.

Neben der 'Aktivierung' durch Substanzen, wie Thioglykollat kennt man auch eine T-Zell vermittelte Makrophagen-Aktivierung (12). Eine spezifische Reaktion zwischen T-Zellen und einem Antigen führt dabei zu einer immunologisch unspezifischen Steigerung der Phagozytose und 'Bakterizidieigenschaften' der so aktivierten Makrophagen (12).

### III.2.5. AKTIVIERUNG MIT THIOGLYKOLLAT UND INFEKTION MIT HSV

Eine i.p. Injektion von Thioglykollat 72 Std. vor der i.p. Infektion mit Herpes-Virus bzw. vor der Gewinnung des Peritonealexsudats hat sowohl Folgen auf die Ausbreitung und Pathogenität des Virus in vivo als auch auf das Vermehrungsverhalten des Virus in vitro in aus so vorbehandelten Mäusen gewonnenen Kulturen aus aktivierten Makrophagen im Vergleich zu nicht vorbehandelten Mäusen bzw. normalen Makrophagen.

So zeigt Schindling (86), daß die Gabe von Thioglykollat 72 Std. i.p. vor Infektion mit HSV vom Typ I bei NMRI-Mäusen zu einer Verminderung der Mortalität führt.

Wird hingegen mit HSV vom Typ II i.p. infiziert, stellt man fest, daß es 72 Std. nach einer Vorbehandlung mit Thioglykollat zu einer Steigerung der Mortalität kommt (86). Gleichzeitig beobachtet Schindling (86) eine gesteigerte Vermehrung von Typ I in aktivierten Makrophagen in vitro gegenüber einer leichten Vermehrung dieses Typs in Makrophagen unbehandelter Mäuse, gemessen mit der Titrationsmethode, wie unter II.6. beschrieben.

Für HSV vom Typ II wird keine Vermehrung in Makrophagen aus unbehandelten Mäusen des Stammes NMRI und auch keine eindeutige Vermehrung in aktivierten Makrophagen dieser Mäuse beobachtet (86).

In normalen und aktivierten Makrophagen aus C 57/bl-Mäusen zeigt sich keine wesentliche Vermehrung, weder von HSV Typ I noch von HSV des Typs II (86).

### III.3. AUFGABEN UND ZIEL

In den Arbeiten verschiedenster Autoren (44,46,58,63,86, 90,102) wird über die Vermehrung des Herpes-Virus in Makrophagen und über die Rolle der Makrophagen bei der HSV-Infektion der Maus berichtet.

Im Zusammenhang mit diesen Arbeiten ist es von Interesse den Einfluß der Infektion mit HSV auf die Verwertung von  $^3\text{H}$ -Thymidin als Ausdruck einer Synthese von DNA bzw. von  $^3\text{H}$ -Uridin als Ausdruck einer Synthese von RNA auf die einzelnen Zellen in einer Makrophagenkultur beziehen zu können.

Das nur geringgradige Auftreten kompletter Viruspartikel (90) als Indiz für nur wenige komplett ablaufende Vermehrungszyklen des Herpes-Virus in Makrophagen, ließ es möglich erscheinen, daß nur in wenigen Zellen und nicht in allen eine Synthese viraler DNA nach Infektion mit HSV in vitro stattfindet.

Möglicherweise wäre mit einer virusinduzierten DNA-Produktion nur in den wenigen, sowieso schon zelluläre DNA bildenden Makrophagen zu rechnen.

Die auf einzelne Zellen einer Makrophagenpopulation bezogenen Untersuchungen waren auch nicht zuletzt deshalb von Interesse, weil für Kulturen aus Makrophagen auf Grund funktioneller Unterschiede der einzelnen Mitglieder, wie die unterschiedliche Fähigkeit zur Phagozytose (73) oder zur Produktion von immunogener RNA (37), angenommen werden

kann, daß sich eine Makrophagenkultur aus funktionell heterogenen Makrophagen zusammensetzt (98) und möglicherweise diese Heterogenität eine Rolle bei einer viralen Infektion spielen kann.

Da mit der Autoradiographie eine Verfolgung radioaktiver Prekursoren auf zellulärer Ebene möglich ist, wurde deshalb mit dieser Methode die Inkorporation von  $^3\text{H}$ -Thymidin und  $^3\text{H}$ -Uridin in nicht infizierte und mit Herpes-Virus infizierte Makrophagen untersucht.

Um die von anderen (38,63,86) beobachteten Unterschiede bei Infektion mit HSV vom Typ I oder Typ II zu berücksichtigen, wurde jeweils mit HSV vom Typ I oder vom Typ II infiziert.

Daneben sollte durch Verwendung von Makrophagen aus jungen und älteren Mäusen mögliche Reifungseinflüsse, durch Verwendung von Makrophagen aus unterschiedlichen Häusestämmen mögliche wirtsspezifische Einflüsse und durch die Verwendung von aktivierten Makrophagen der Einfluß einer 'Aktivierung' durch Thioglykollat untersucht werden.

### III.4. ERGEBNISSE

#### III.4.1. DER EINBAU VON $^3\text{H}$ -THYMDIN IN MAKROPHAGEN AUS NMRI- UND C 57/BL-MÄUSEN

##### III.4.1.1. PULSDAUER UND DER EINBAU VON $^3\text{H}$ -THYMDIN IN MAKROPHAGEN

In nicht infizierten als auch infizierten Makrophagen führten  $^3\text{H}$ -Thymin-Pulse von 1 Std. Dauer mit Aktivitäten von 1  $\mu\text{Ci}/1.5\text{ml}$  bis 2.5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  nicht zu einer verwertbaren autoradiographischen Markierung der Zellen.

In NMRI-Makrophagen zeigten sich unter diesen Bedingungen sowohl in den Kontrollen als auch in den vorher mit HSV (Herpes-Virus) infizierten Makrophagenkulturen einzelne Makrophagen mit 2-3 Silberkörnern (SK) über dem Kern, wobei ein wesentlicher Unterschied zwischen infizierten und nicht infizierten nicht feststellbar war.

In Populationen aus aktivierten NMRI-Makrophagen konnten unter diesen Bedingungen 2-5 % Zellen mit bis zu 5 SK über dem Kern beobachtet werden, ohne daß ein Unterschied hinsichtlich der Markierung zwischen Kontrollen und infizierten Zellen feststellbar gewesen wäre. Daneben fanden sich vereinzelt Makrophagen mit mehr als 5 SK über dem Kern.

$^3\text{H}$ -Thymin-Pulse von 2 bis 18 Std. Dauer führten dagegen zu einer deutlichen Zellmarkierung mit Unterschieden zwischen normalen, aktivierten, infizierten und nicht infizierten Zellen, wenn 2.5  $\mu\text{Ci}/1.5\text{ ml}$  an Aktivität gegeben wurde.

In Makrophagenkulturen aus C 57/bl -Mäusen konnte selbst unter diesen Bedingungen keine autoradiographisch verwertbare Markierung nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymin

festgestellt werden.

Auch mit HSV infizierte C 57/bl-Makrophagen zeigten unter diesen Bedingungen keine autoradiographisch verwertbare Markierung nach  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkubation.

III.4.1.2. MARKIERUNG DURCH  $^3\text{H}$ -THYMIDIN IN NORMALEN  
NICHT INFIZIERTEN UND MIT HSV INFIZIERTEN  
MAKROPHAGEN AUS NMRI-MÄUSEN

III.4.1.2.1. KONTROLLEN

In Populationen aus normalen nicht infizierten Makrophagen zeigen 5-19 % Zellen eine Kernmarkierung nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin über 2,6,10 bzw. 18 Std. und einer Aktivität von 2,5 uCi/1,5ml (Histogr.Nr. 1 u. 2 ) .

Der größte Teil der markierten Zellen weist dabei mit einer SK-Zahl von bis zu 5 SK/Kern nur eine schwache Markierung auf (Histogr. 3 u. 5 ) .

In einer Makrophagenkultur beobachtet man eine geringe DNA-Synthese nur in wenigen Zellen.

Populationen aus jungen Makrophagen zeigen in Vergleich zu älteren (Histogr. Nr. 1 u. 2 ) um bis zu 10 % mehr über dem Kern markierte Zellen. Mit zunehmender Inkubationsdauer erfolgt hier eine Zunahme des Anteils  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau zeigender Zellen (Histogr.Nr. 2 ) .

Die Fähigkeit DNA zu synthetisieren ist in Populationen aus jungen Makrophagen vermehrt erhalten, wie die Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin zeigt.

Stärker über dem Kern markierte Makrophagen kommen nur in einer Häufigkeit von weniger als 1 % vor (Histogr. Nr. 7 u. 9; Abb.Nr. 1 ) .



Abb.Nr.1 Stark markierter 'junger' Makrophage nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin über 2 Std.



Abb.Nr.2 Mit HSV-Iennette infizierte 'alte' Makrophagen, welche von der 2 bis 8 Std. p.i. mit  $^3\text{H}$ -Thymidin inkubiert wurden. Über mehreren Zellen sieht man eine deutliche Markierung des Kerns

Ein wesentlicher Unterschied kann hier zwischen Populationen aus alten und jungen Makrophagen nicht festgestellt werden.

Eine Vermehrung dieser relativ stark markierten Zellen ist auch nach längerer Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin nicht festzustellen (Histogr. Nr. 7 u. 9 ).

Teilungsfiguren wurden nicht beobachtet.

#### III.4.1.2.2. MIT STAMM 'LENNETTE' UND STAMM 'D-316' INFIZIERTE MAKROPHAGEN

Nach der Infektion mit HSV steigt die Zahl der über dem Kern markierten Zellen nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin post infectionem (p.i.) in den Makrophagenpopulationen wesentlich (Histogr.Nr. 1 u. 2 ) .

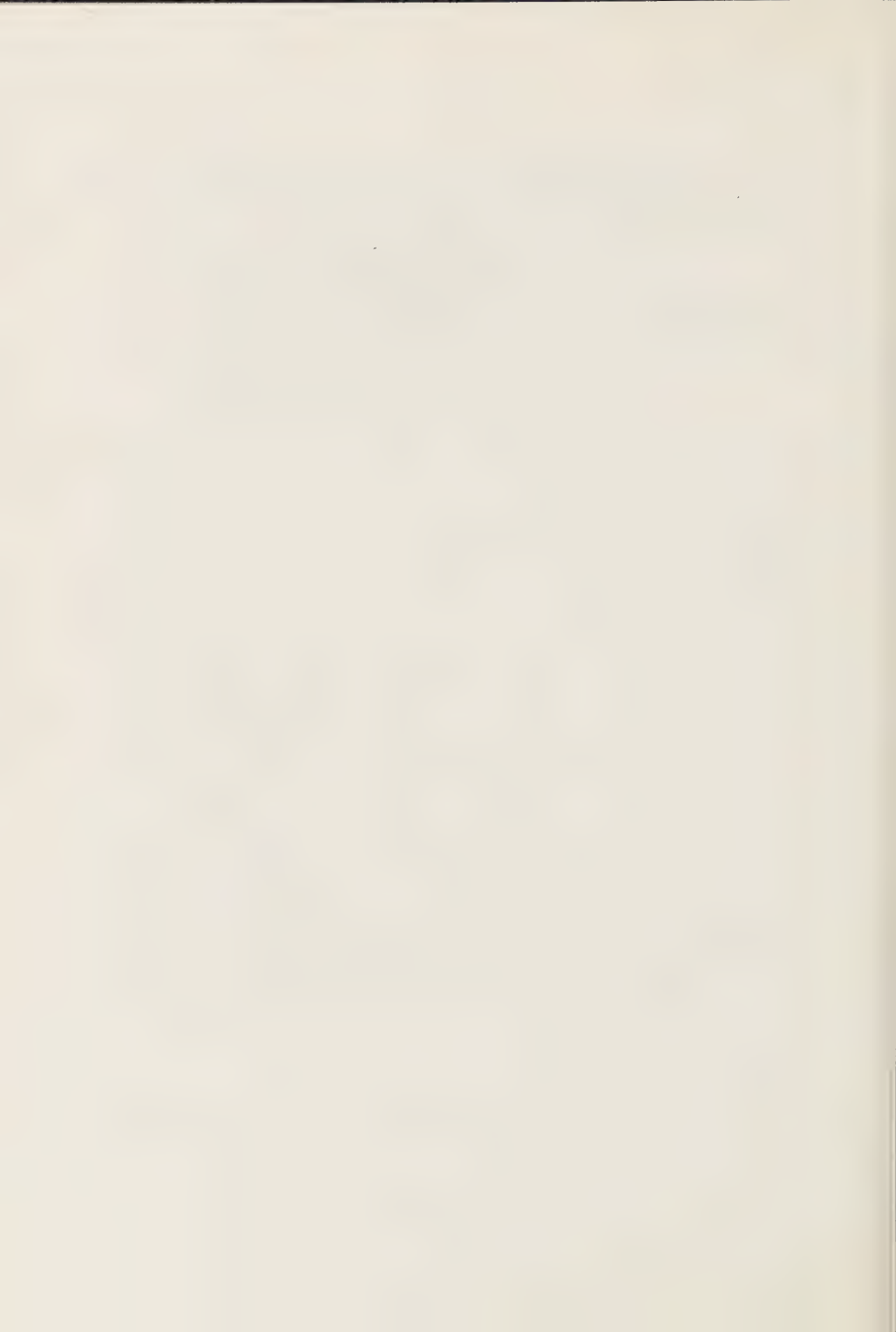
Wie das Histogramm Nr. 1 zeigt,erreicht z.B. der Anteil p.i. markierter Makrophagen in einer Population aus alten Makrophagen mehr als 50 % nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin 2-8 Std. p.i. in mit HSV-Lennette infizierten Kulturen.

Die Zahl der Zellen,die p.i. eine Markierung nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin zeigen ist wesentlich größer als in nicht infizierten Makrophagenpopulationen (Histogr. Nr. 1 u. 2 ).

Durch die Infektion mit HSV muß also auch in solchen Zellen,die ohne Infektion keine Markierung d.h. keine zelluläre DNA-Synthese zeigen,der Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin 'induziert' werden.Im weitaus größten Teil der p.i. markierten Zellen ist eine virusinduzierte DNA-Synthese abgelaufen.

Ein großer Teil der p.i. markierten Zellen weist mehr als 5 SK/Kern auf (Histogr.Nr. 7 u. 9;Abb.Nr.2 ).

Die Infektion mit HSV induziert den Einbau von viel  $^3\text{H}$ -Thymidin.



Vergleicht man die Populationen aus alten und jungen Makrophagen stellt man fest, daß in beiden nach der Infektion zwar mehr Zellen  $^3\text{H}$ -Thymidin einbauen (Histogr. Nr. 1 u. 2 ). In Populationen aus alten Makrophagen erfolgt aber in mehr Zellen eine Markierung durch  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation p.i. als in solchen aus jungen Makrophagen. Die Histogramme Nr. 7 u. 9, die den Anteil der mit mehr als 5 SK/Kern markierten Zellen zeigen, machen diesen Unterschied deutlich. Gleichzeitig wird gezeigt, daß die Infektion mit HSV in Populationen aus alten Makrophagen nicht nur in mehr Zellen, sondern auf die einzelne Zelle bezogen auch in verstärktem Maß die Inkorporation von  $^3\text{H}$ -Thymidin induziert, was sich in dem größeren Anteil stark über dem Kern markierter Zellen zeigt.

Das Zellreservoir, in dem eine Infektion mit HSV DNA-Synthese induzieren kann, ist in Populationen aus alten Makrophagen größer als in Populationen aus jungen Makrophagen.

Dies gilt vor allem für die Infektion mit HSV vom Stamm Lennette.

In Populationen aus alten Makrophagen (Histogr. Nr. 1, 3 u. 7 ) sind in der Kontrolle bei Markierung mit  $^3\text{H}$ -Thymidin über 6 Std. (Inkubationszeitraum: 2-8 Std.) 9 % Zellen markiert. Davon sind bezogen auf die Gesamtpopulation weniger als 1 % mit mehr als 5 SK/Kern markiert (Histogr. Nr. 7 ) .

Nach der Infektion sind 30 % (mit dem Stamm Lennette infizierte) bzw. 16 % (mit dem Stamm D-316 infizierte) bei Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin 2-8 Std. p.i. mit mehr als 5 SK/Kern markiert (Histogr. Nr. 7 ) .

Die Infektion mit HSV induziert also initial in einem großem Teil der Makrophagen eine DNA-Synthese mit hoher Syntheserate.

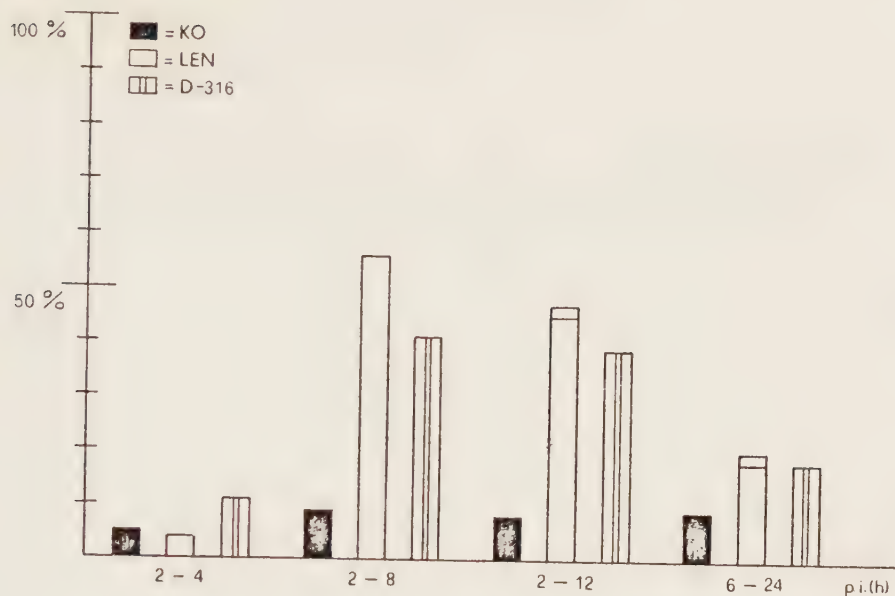
Histogr.Nr.1

Anteil der überhaupt markierten Zellen in Populationen aus alten Makrophagen nach p.i. durchgeführten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer

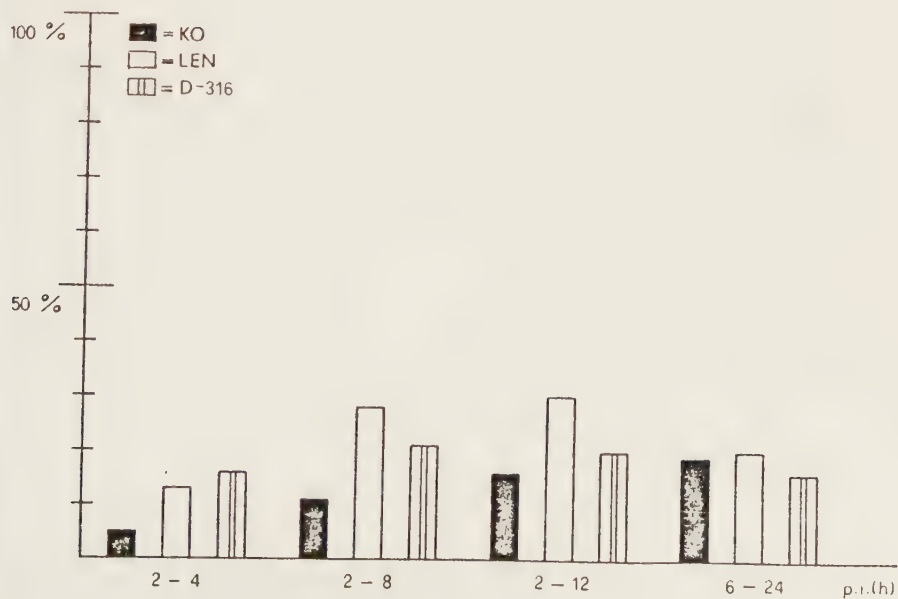
Histogr.Nr.2

Anteil der überhaupt markierten Zellen in Populationen aus jungen Makrophagen nach p.i. durchgeführten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer

Histogr. Nr. 1



Histogr. Nr. 2



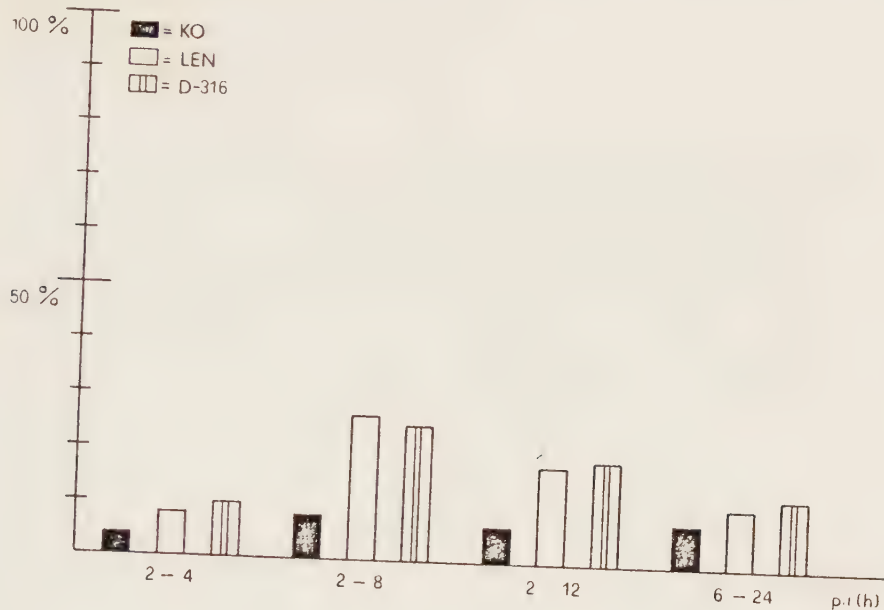
Histogr.Nr. 3

Anteil der Zellen mit bis zu 5 SK/Kern in Populationen aus alten Makrophagen nach p.i. durchgeführten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer

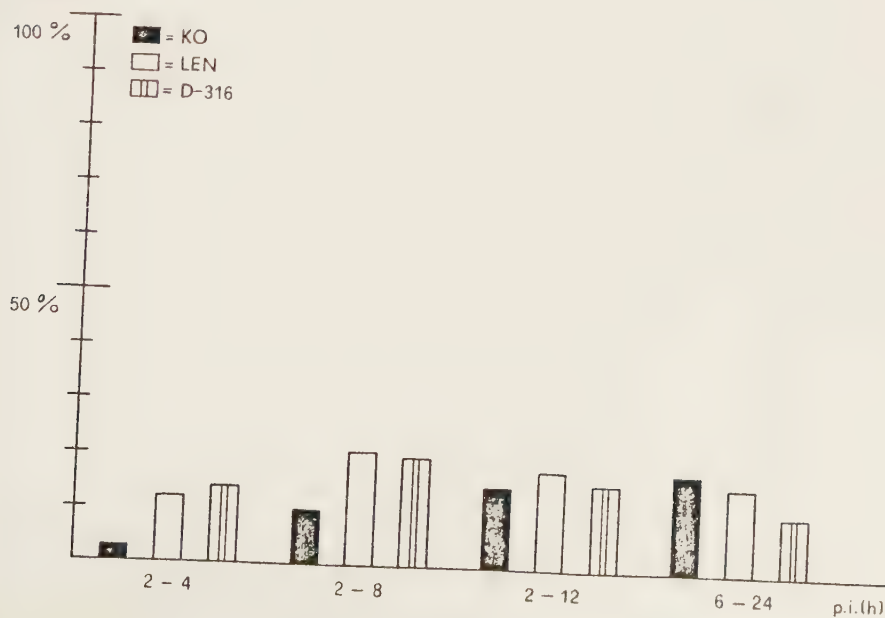
Histogr.Nr. 5

Anteil der Zellen mit bis zu 5 SK/Kern in Populationen aus jungen Makrophagen nach p.i. durchgeführten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer

Histogr. Nr. 3



Histogr. Nr. 5



Histogr.Nr. 7

Anteil der Zellen mit mehr als 5 SK/Kern in Populationen aus alten Makrophagen nach p.i. durchgeführten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer.

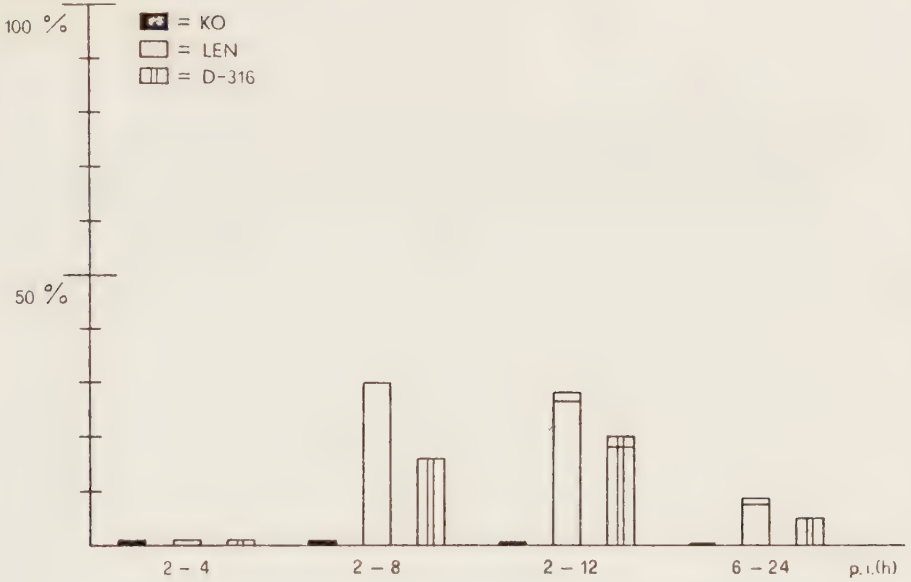
(die Säulen oberhalb des Querbalkens repräsentieren jeweils denjenigen Zellanteil, der neben einer Kernmarkierung mit mehr als 5 SK/Kern auch gleichzeitig mehr als 5 SK über dem Cytoplasma aufweist )

Histogr.Nr. 8

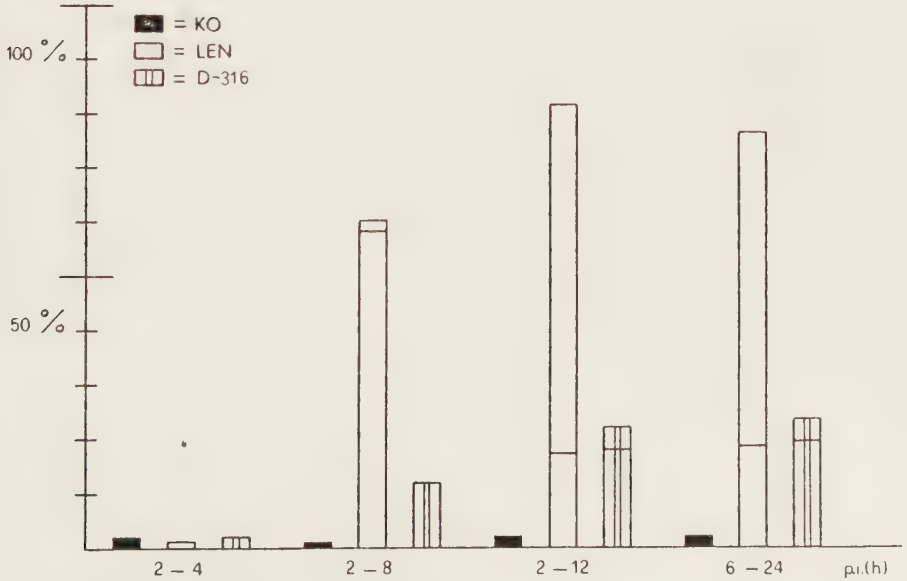
Anteil der Zellen mit mehr als 5 SK/Kern in Populationen aus alten aktivierten Makrophagen nach p.i. durchgeführten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer

(die Säulen oberhalb des Querbalkens repräsentieren jeweils denjenigen Zellanteil, der neben einer Kernmarkierung mit mehr als 5 SK/Kern auch gleichzeitig mehr als 5 SK über dem Cytoplasma aufweist )

Histogr. Nr. 7



Histogr. Nr. 8



Histogr.Nr. 9

Anteil der Zellen mit mehr als 5 SK/Kern in Populationen aus jungen Makrophagen nach p.i. durchgeführten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer

Histogr.Nr. 10

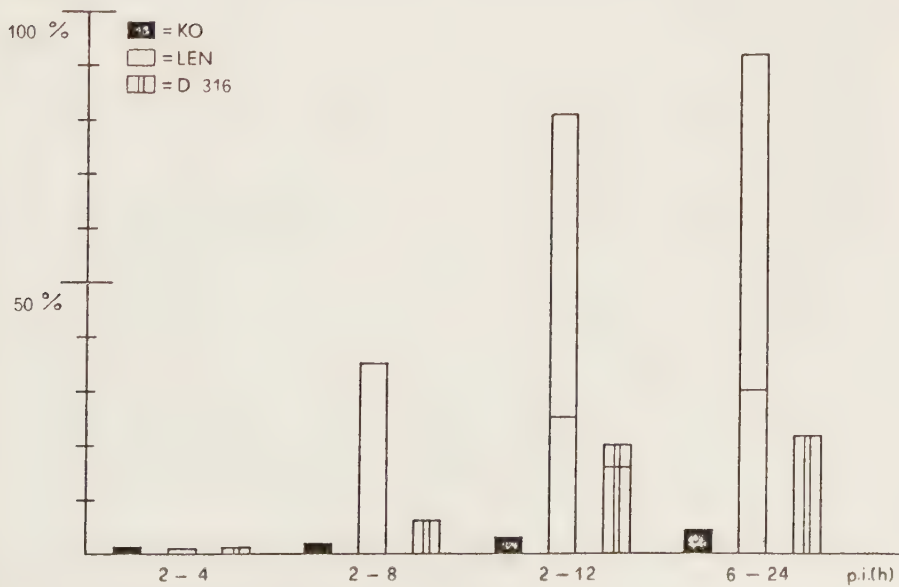
Anteil der Zellen mit mehr als 5 SK/Kern in Populationen aus jungen aktivierten Makrophagen nach p.i. durchgeführten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer

(die Säulen oberhalb des Querbalkens repräsentieren jeweils denjenigen Zellanteil, der neben einer Kernmarkierung mit mehr als 5 SK/Kern auch gleichzeitig mehr als 5 SK über dem Cytoplasma aufweist )

Histogr. Nr. 9



Histogr. Nr. 10



Weiter fällt auf, daß durch die Infektion mit dem Stamm Lennette (HSV Typ I) in mehr Zellen einer Makrophagenpopulation p.i. eine  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation induziert wird als durch die Infektion mit dem Stamm D-316 (HSV Typ II) (Histogr.Nr. 1u.2 ).

Die größere Fähigkeit des Stammes Lennette in mehr Zellen einer Makrophagenpopulation eine DNA-Synthese zu induzieren als der Stamm D-316 zeigt sich vor allem in einem größeren Anteil stark markierter Zellen in mit dem Stamm Lennette infizierten Makrophagenpopulationen (Histogr. Nr. 7 u. 9 ).

Damit im Zusammenhang zu sehen ist auch der weitaus größere Zellverlust durch cytopathischen Effekt in mit dem Stamm Lennette infizierten Makrophagenpopulationen im Vergleich zu solchen, die mit dem Stamm D-316 infiziert wurden.

Der Zellverlust durch cytopathischen Effekt ist in derjenigen Makrophagenpopulation am größten, die p.i. die größere Zahl über dem Kern markierter Zellen aufweist (s.d. Tab.Nr. 1 u. Histogr. Nr. 1 u. 2 ).

Wie aus den Abbildungen Nr. 4 und Nr. 5 hervorgeht, erscheint die Makrophagenpopulation schon 12 Std. nach der Infektion mit HSV-Lennette (Abb.Nr.5) und noch mehr 24 Std. nach der Infektion (Abb.Nr.6) stark gelichtet.

Die Zelldichte bei ursprünglich annähernd gleich dicht bewachsenen Deckgläschen- 24 Std. p.i. in mit HSV-D-316 infizierten Kulturen hat damit verglichen nur geringgradig abgenommen (Abb.Nr.7); in gleichbehandelten BHK-Kulturen ist der Zellverlust 24 Std. p.i. im Vergleich zu den entsprechenden Makrophagenkulturen am geringsten (s.d.Tab.Nr.3).

Die meisten cytopathisch veränderten Makrophagen zeigen eine Kernmarkierung, wie in Abb.Nr.2. In ihnen läuft virus-induzierte DNA-Synthese ab.

Nur vereinzelt beobachtet man auch cytopathisch veränderte Zellen die nicht markiert sind.

Tabelle Nr.1 Zellverlust durch cytopathischen Effekt in der normalen  
Makrophagenpopulation

| Zur Infektion<br>verwandtes HSV | % der Zellen<br>m.Kernmarkierung | Zeit<br>p.i. | noch vorhandene Zellzahl<br>p.i.<br>(Zellzahl i.d. Ko=100%) |
|---------------------------------|----------------------------------|--------------|-------------------------------------------------------------|
| Lennette                        | 30-47%                           | 12 std.      | 30-40%                                                      |
|                                 | 20 %                             | 24 Std.      | 15-25%                                                      |
| D-316                           | 16-17%                           | 24 Std.      | 45-60%                                                      |

Tabelle Nr.2 Zellverlust durch cytopathischen Effekt in der aktivierten  
Makrophagenpopulation

| Zur Infektion<br>verwandtes HSV | % der Zellen<br>m.Kernmarkierung | Zeit<br>p.i. | noch vorhandene Zellzahl<br>p.i.<br>(Zellzahl i.d. Ko=100%) |
|---------------------------------|----------------------------------|--------------|-------------------------------------------------------------|
| Lennette                        | 90-94%                           | 12 Std.      | 68-78%                                                      |
|                                 | 83-94%                           | 24 Std.      | 4-10%                                                       |
| D-316                           | 33-35%                           | 24 Std.      | 50-60%                                                      |

Tabelle Nr.3 Zellverlust durch cytopathischen Effekt in der BHK-Zell-  
kultur

| Zur Infektion<br>verwandtes HSV | % der Zellen<br>m.Kernmarkierung | Zeit<br>p.i. | noch vorhandene Zellzahl<br>p.i.<br>(Zellzahl i.d. Ko=100%) |
|---------------------------------|----------------------------------|--------------|-------------------------------------------------------------|
| Lennette                        | 80-85%                           | 24 Std.      | 70-80%                                                      |
| D-316                           | 67-72%                           | 24 Std.      | 67-77%                                                      |



Abb.Nr.4 Zelldichte in einer Kultur aus 'alten' Makrophagen 24 Std. nach Versuchsbeginn

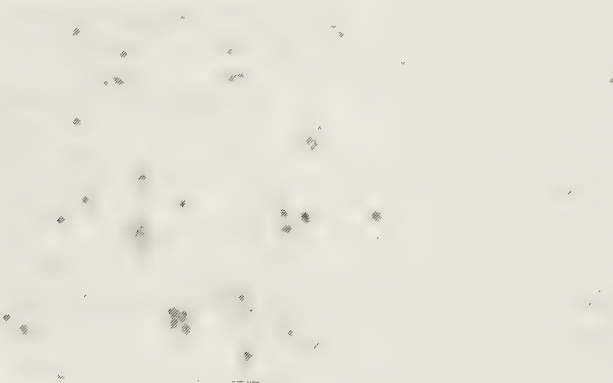


Abb.Nr.5 Zelldichte in einer mit HSV-Lennette infizierten Kultur aus 'alten- Makrophagen 12 Std. p.i. .Cytopathische Veränderungen und Abnahme der Zelldichte wird bereits deutlich

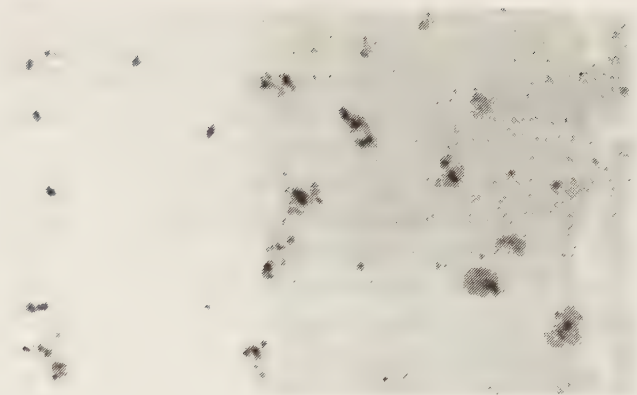


Abb.Nr.6 Zelldichte in einer mit HSV-Lennette infizierten Kultur aus 'alten' Makrophagen 24 Std. p.i. .Im Vergleich zu Abb.Nr.4 wird der große Zellverlust deutlich,der wesentlich größer ist als in der entsprechenden mit HSV-D-316 infizierten Kultur (Abb.Nr. 7)



Abb.Nr.7 Zelldichte in einer mit HSV-D-316 infizierten Kultur aus 'alten' Makrophagen 24 Std. p.i. .Zwar hat auch hier die Zelldichte im Vergleich zu der nicht infizierten Kultur (Abb.Nr.4) abgenommen,aber nicht in dem gleichen Maße wie in der mit HSV-Lennette infizierten Makrophagenkultur (Abb.Nr.6) .

Verfolgt man die Zu- und Abnahme des Anteils der markierten Makrophagen p.i. fällt auf, daß es zunächst zu einer starken Zunahme markierter Zellen im Markierungszeitraum 2-8 Std. p.i. kommt, die Anzahl markierter Zellen nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin 6-24 Std. p.i. aber wieder deutlich geringer wird (Histogr.Nr. 1 u. 2).

Dieser Effekt ist in Populationen aus alten Makrophagen deutlicher als in der Population aus jungen Makrophagen (Histogr.Nr. 1 u. 2).

Zellen, die bei Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin 2-8 Std. p.i. und 2-12 Std. p.i. virusinduzierte DNA-Synthese zeigten, müssen zerstört worden sein und sich vom Deckglas gelöst haben. Im Autoradiogramm 6-24 Std. p.i. gehen sie nicht mehr in die Auswertung ein.

Unter der Voraussetzung, daß die zur Infektion verwandte Menge pfu ausreichend war, um alle in der Kultur vorhandenen Makrophagen zu infizieren, muß man auch folgern, daß das Reservoir derjenigen Makrophagen, in denen die Infektion mit HSV DNA-Synthese induzieren kann, mit zunehmender Zeitdauer p.i. immer mehr abnimmt.

Bei der Inkubation 6-24 Std. p.i. zeigt nur noch ein kleiner Teil der Zellen  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation, während der größere Teil der Makrophagen gegen eine virale Induktion der DNA-Synthese 'resistent' erscheint (Histogr. Nr. 1 u. 2). Zu beachten ist aber, daß bei gleichzeitiger Abnahme der absoluten Zellzahl in der infizierten Kultur (s.d. Tab.Nr. 1) die Zunahme dieser 'resistenten' Zellen im 24 Std. p.i. fixierten Präparat nur relativ ist.

Trotz einer Infektion mit 6-10 pfu pro Makrophage wird p.i. initial (2-8 Std. p.i.) nur in 10 % bis 47 % der Zellen einer Makrophagenpopulation durch die Infektion der Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin in Abhängigkeit vom Alter der Makrophagen und Art des infektiösen Partikels induziert.

Z.B. liegt in Populationen aus alten Makrophagen (Histo-gr.Nr. 1 ) die Zahl der Zellen mit Markierung über dem Kern nach Infektion mit HSV-Lennette und Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin in der 2-8 Std. p.i. bei 55 % und bei Infekt-mit HSV-D-316 bei 41 % (Histogr.Nr.1) .

In der Kontrollpopulation (Histogr.Nr. 1) beträgt der Anteil nach dem Inkubationszeitraum 2-8 Std. p.i. über dem Kern markierter Zellen 9 %.

Für den Anteil, in dem sicher nur virusinduzierte DNA-Synthese abläuft, ergeben sich für die mit HSV-Lennette infizierte Makrophagenpopulation 46 % und für die mit HSV-D-316 infizierte Makrophagenpopulation 32%.

Für Populationen aus jungen Makrophagen gilt entsprechendes. (Wie unter III.5.1. dargelegt, ist die p.i. auftretende Kernmarkierung in allen Zellen durch die Synthese virus-spezifischer DNA bedingt. Das heißt, daß der Prozentsatz der in der Kontrollpopulation markierten Zellen nicht vom Anteil der p.i. markierten Zellen abgezogen werden muß, um denjenigen Anteil Zellen in der Makrophagenpopu-lation zu ermitteln, in dem eine 'sicher' virusinduzierte DNA-Synthese abläuft.)

Daraus ergibt sich, daß in einem großen Teil der Makro-phagen einer Makrophagenkultur die Infektion mit HSV zunächst keine Wirkung auf den  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbau hat. Die Infektion mit HSV induziert initial nur in einem Teil der Zellen den Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin. Die Zusammen-setzung der Makrophagenpopulation bezüglich der initialen Induzierbarkeit einer DNA-Synthese durch die Infektion mit HSV erscheint heterogen.

Die Synthese virusinduzierter DNA beginnt in den Mitgliedern einer Makrophagenpopulation p.i. unterschiedlich schnell.

### Cytoplasmatische Markierung p.i.

Nach Inkubation 2- 12 Std. p.i. beobachtet man in Populationen aus alten Makrophagen etwa 2 % Zellen, die neben einer Kernmarkierung mit mehr als 5 SK/Kern auch gleichzeitig mehr als 5 SK über dem Cytoplasma zeigen. (s.d.a. Histogr.Nr. 7)

Diese cytoplasmatische Markierung, die i.d.R. nicht mehr als 15-20 SK beträgt, wurde nicht über Zellen beobachtet, welche nicht gleichzeitig über dem Kern markiert sind. Eine cytoplasmatische Markierung dieser Art wurde in den Kontrollen oder in den Populationen aus jungen Makrophagen nicht gesehen.

### Morphologische Besonderheiten p.i.

Im Gegensatz zu den mit HSV-Lennette infizierten Makrophagen, die eine weitgehend homogene Markierung über dem Kern zeigen (Abb.Nr. 8), beobachtet man in mit HSV-D-316 infizierten Makrophagenpopulationen vermehrt Makrophagen mit markierten Kernabkugelungen und auf bestimmte Kernareale beschränkte Markierungen nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin, wie in Abb.Nr. 9.

Nicht markierte Kernabkugelungen finden sich sowohl nach Infektion mit HSV-Lennette als auch nach Infektion mit HSV-D316 in den Makrophagen.

Doppelkernige Zellen, die z.T. über dem Kern markiert sind, sowie vereinzelt Zellen mit mehr als zwei Kernen kommen in allen mit HSV infizierten Makrophagenpopulationen vor.

In mit HSV-Lennette infizierten Makrophagenpopulationen beobachtet man vereinzelt Zellen, die in ihrer Morphologie aktivierten Makrophagen gleichen (Abb.Nr. 8): Sie sind größer als normale Makrophagen, haben mehr Cytoplasma und zeigen vermehrt cytoplasmatische Vakuolen.

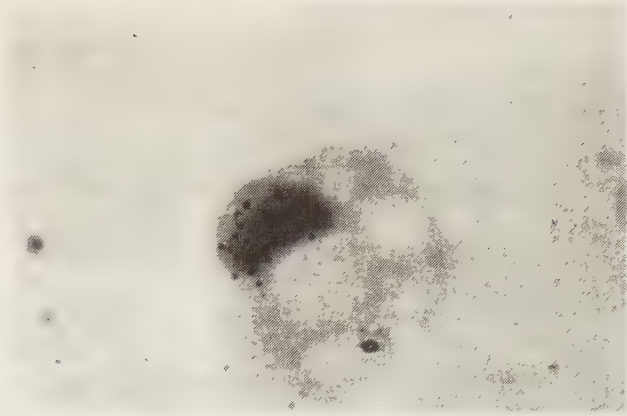


Abb.Nr.8 Mit HSV-Lennette infizierter 'junger' Makrophage nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin 2. bis 8. Std. p.i. . Neben einer deutlichen Markierung des Kerns, werden große Vakuolen sichtbar, wie sie auch bei aktivierten Makrophagen auftreten (s.a. Abb.Nr. 10 u. 11 )

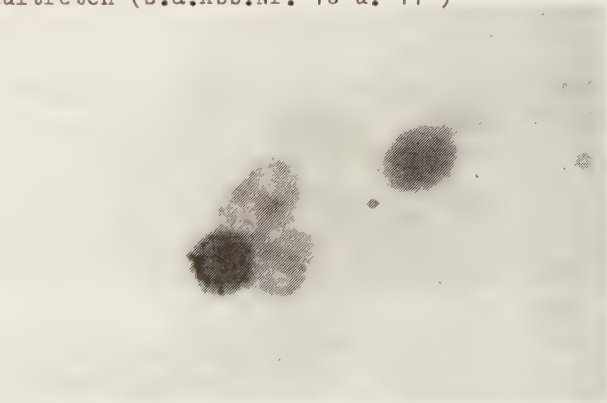


Abb.Nr.9 Mit HSV-D-316 infizierter 'junger' Makrophage nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin 2. bis 12. Std. p.i. . Deutlich sieht man eine markierte und eine unmarkierte Kernabkuglung bei nicht markiertem Kern

III.4.1.3. MARKIERUNG DURCH  $^3\text{H}$ -THYMIDIN IN AKTIVIERTEN  
NICHT INFIZIERTEN UND MIT HSV INFIZIERTEN  
MAKROPHAGEN AUS NMRI-MÄUSEN

III.4.1.3.1. KONTROLLEN

In Populationen aus nicht infizierten aktivierten Makrophagen beobachtet man 2-9 % über dem Kern markierte Zellen nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin über 2,6,10 bzw. 18 Std. (Histogr.Nr. 11 u 12 ).

Ein wesentlicher Unterschied zwischen jungen und alten aktivierten Makrophagen in bezug auf den Anteil markierter Zellen nach  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkubation, wie bei den nicht aktivierten Makrophagen, ist dabei nicht festzustellen. Vielmehr hat die Aktivierung den Anteil  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbau zeigender Zellen in Populationen aus alten und jungen Makrophagen nivelliert.

Der Anteil  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation zeigender Zellen ist in Populationen aus jungen aktivierten Makrophagen nicht mehr größer als in Populationen aus alten aktivierten Makrophagen (Histogr.Nr. 1/2 u. 11/12 ).

In Populationen aus aktivierten Makrophagen sind 1-8 % der überhaupt markierten Zellen schwach markiert (Histogr.Nr. 4 u. 6 ).

Besonders in Populationen aus jungen aktivierten Makrophagen wurde der Anteil der mit weniger als 5 SK/Kern markierten Zellen gegenüber der vergleichbaren Population aus normalen jungen Makrophagen durch die Aktivierung deutlich vermindert (Histogr.Nr. 6 u. 5 ).

Der verminderte Anteil überhaupt markierter Zellen bei jungen aktivierten Makrophagen im Vergleich zu jungen normalen ist hierauf zurückzuführen.



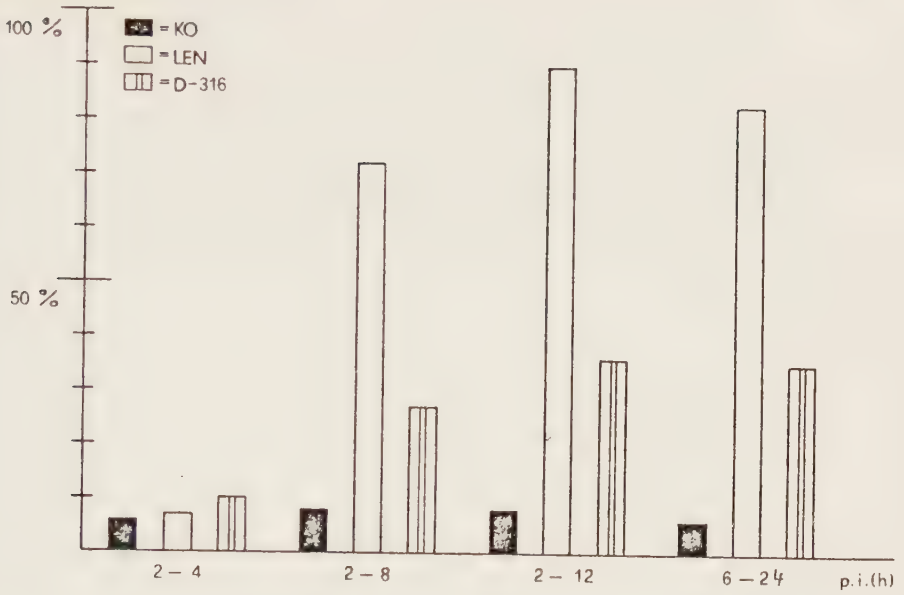
Histogr.Nr. 11

Anteil der überhaupt markierten Zellen in Populationen  
aus alten aktivierten Makrophagen nach p.i. durchge-  
führten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer

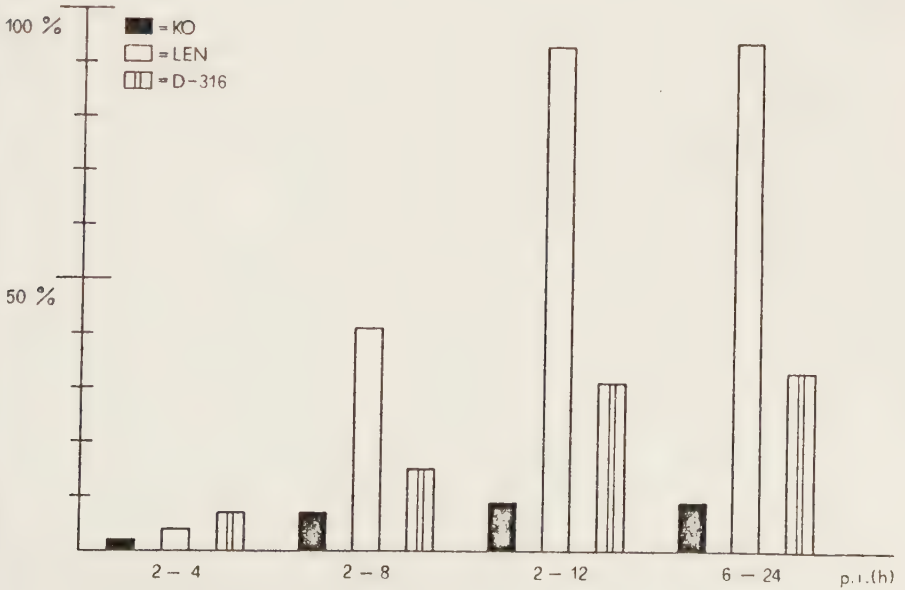
Histogr.Nr. 12

Anteil der überhaupt markierten Zellen in Populationen  
aus jungen aktivierten Makrophagen nach p.i. durchge-  
führten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer

Histogr. Nr. 11



Histogr. Nr. 12



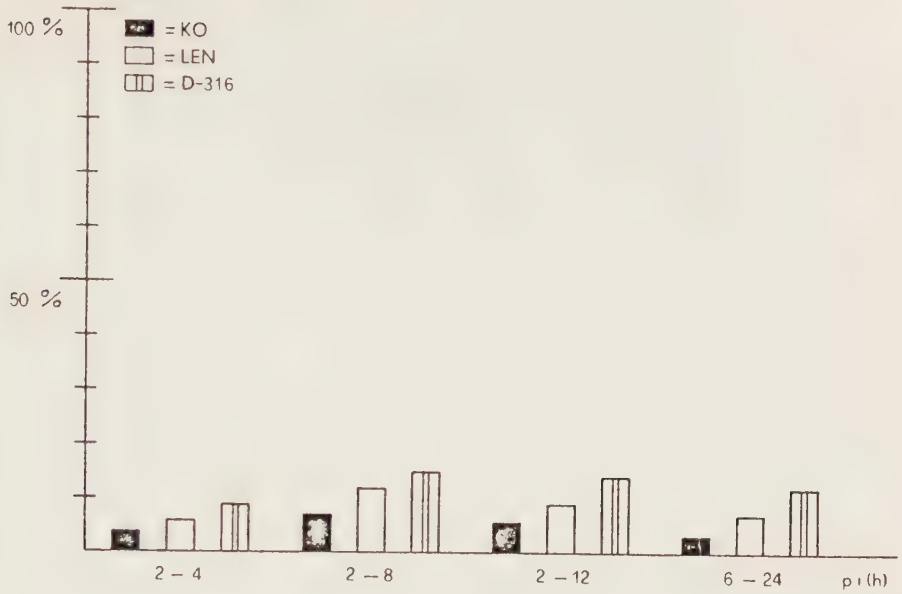
Histogr.Nr. 4

Anteil der Zellen mit bis zu 5 SK/Kern in Populationen aus alten aktivierten Makrophagen nach p.i. durchgeführten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer

Histogr.Nr. 6

Anteil der Zellen mit bis zu 5 SK/Kern in Populationen aus jungen aktivierten Makrophagen nach p.i. durchgeführten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer

Histogr. Nr. 4



Histogr. Nr. 6



Einen deutlichen Unterschied zu normalen Makrophagen beobachtet man in Bezug auf das Vorkommen von stark über dem Kern markierten Zellen in Kulturen aus aktivierten Makrophagen.

Zum einen zeigt sich ein höherer Anteil stark markierter Zellen mit mehr als 5 SK/Kern, nämlich 1-4 % (Histogr.Nr. 8 u. 10 ).

Zum anderen ist die SK-Zahl mit im Durchschnitt über 100 SK/Kern wesentlich höher als bei stark markierten normalen Makrophagen (s.a.Abb.Nr. 10).

In Populationen aus aktivierten Makrophagen zeigen sich Zellen, die durch eine starke Markierung nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin anzeigen, daß in ihnen im Inkubationszeitraum eine rege zelluläre DNA-Synthese abgelaufen ist.

Diese stark über dem Kern markierten Zellen stellen eine Gruppe teilungsfähiger Zellen innerhalb der Population aus aktivierten Makrophagen da, wie die Abbildungen Nr. 12 u. 13 zeigen.

Markierte Teilungsfiguren finden sich schon nach  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen von 10 Std. Dauer (2-12 Std.) in den Makrophagenpopulationen.

Zum Teil kommt es nur zur Kernteilung ohne anschließende Zellteilung, wie die Abbildung Nr. 11 zeigt.

Es resultieren meist zweikernige, selten dreikernige Makrophagen.

Mit zunehmender Inkubationsdauer finden sich innerhalb dieser starke zelluläre DNA-Synthese zeigenden Makrophagenfraktion vermehrt Zellen mit unterschiedlicher SK-Zahl/Kern, wie in Abbildung Nr. 13. Durch die zum Teil nachbarliche Lage von Zellen mit etwa gleich stark verringerter SK-Dichte/Kern wird die Vermutung, daß hier sich teilende Zellen mit Verteilung der ursprünglichen Silberkörner auf zwei Tochterzellen vorliegen, gestützt. Auf dem Deckgläschen liegen diese stark markierten Zellen

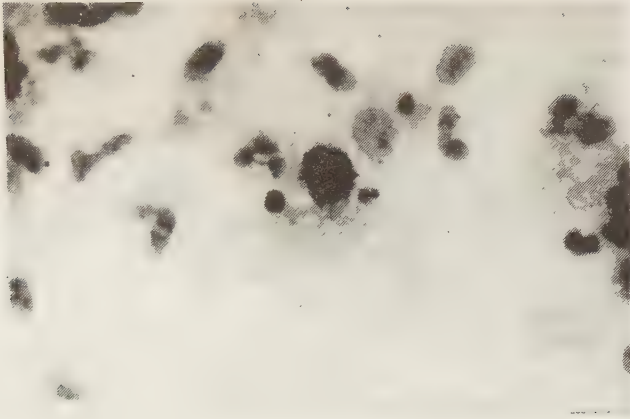


Abb.Nr.10 Stark über dem Kern markierter 'junger' aktivierter Makrophage nach einem  $^3\text{H}$ -Thymidinimpuls von 10 Std. . Die Silberkörner sind so dicht über dem Kern gepackt, daß eine Unterscheidung der einzelnen SK nicht mehr möglich ist; daneben lassen sich deutlich die großen Vakuolen im Cytoplasma erkennen

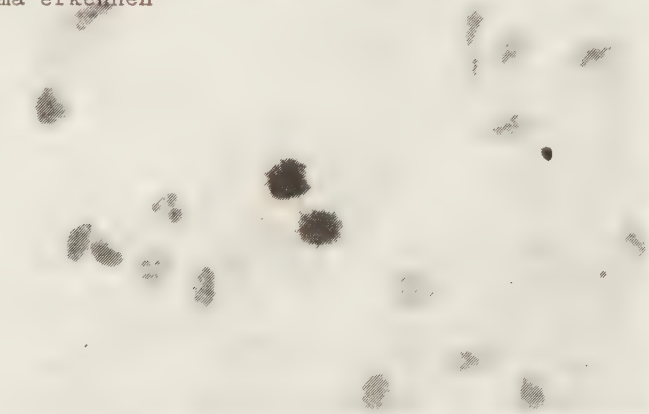


Abb.Nr.11 Zweikerniger 'junger' aktivierter Makrophage nach einem 18 stündigen  $^3\text{H}$ -Thymidinimpuls mit deutlicher Markierung über beiden Kernen; die SK-Dichte ist dabei nicht so groß wie die in Abb.Nr. 10 .

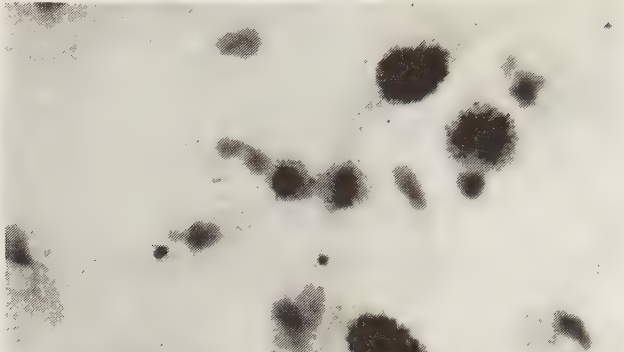


Abb.Nr.12 Ausschnitte aus einer Kultur aus 'jungen' aktivierten Makrophagen nach einem 10 stündigen  $^3\text{H}$ -Thymidin-puls;neben drei Makrophagen mit starker Kernmarkierung sieht man zwei in Teilung befindliche Makrophagen

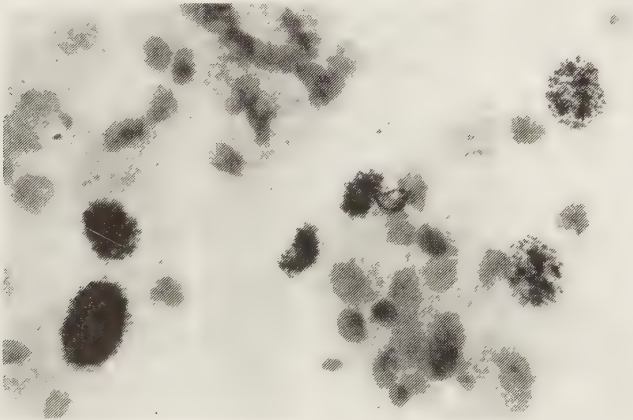


Abb.Nr.13 Ausschnitt aus einer Kultur aus 'jungen' aktivierten Makrophagen nach einem 10 stündigen  $^3\text{H}$ -Thymidin-puls;man erkennt jeweils in der Nachbarschaft liegende Zellen mit etwa gleich verringerter SK-Dichte über dem Kern,z.T. besteht noch zwischen den in Nachbarschaft liegenden Zellen ein Zellkontakt als zusätzlicher Hinweis auf eine vorausgegangene Zellteilung

meist in Gruppen, wobei ihre Teilungsaktivität als dafür mitverursachend angesehen werden kann. Da diese Gruppen auf dem Deckgläschen nicht regelmäßig verteilt sind, sieht man bei der Betrachtung Blickfelder ohne solche stark markierten Makrophagen.

Hierdurch und durch die Methode der Auswertung bedingt (s.d.a.II.10), zeigt sich in den Histogrammen Nr. 8 und Nr. 10 nur ein geringer Zuwachs (Nr. 10) bis Konstanz (Nr. 8) des Anteils dieser Zellen in der Population aus aktivierten Makrophagen, obwohl man bei sich teilenden Zellen eine stetige Vergrößerung ihres Anteils mit zunehmender  $^3\text{H}$ -Thyminid-Pulsdauer erwarten würde.

#### III.4.1.3.2. MIT STAMM 'LENNETTE' UND STAMM 'D-316'

##### INFIZIERTE MAKROPHAGEN

Wie aus den Histogrammen Nr. 11 und 12 hervorgeht, steigt auch in Populationen aus aktivierten Makrophagen nach der Infektion mit HSV die Zahl der über dem Kern markierten Zellen nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thyminid über 2-8, 2-12 bzw. 6-24 Std. p.i. stark an (Histogr. Nr. 11 u. 12; Abb. Nr. 14 u. 15 ).

Wie in Populationen aus normalen Makrophagen ist auch hier die Steigerung der Zahl der p.i. markierten Zellen im wesentlichen auf eine Vergrößerung des Anteils der stark über dem Kern markierten Zellen mit mehr als 5 SK/Kern zurückzuführen, wie ein Vergleich der Histogramme Nr. 6/10 und 4/8 zeigt.

Trotz gleicher zur Infektion verwandter Menge an pfu ist aber im Vergleich zu Populationen aus normalen Makrophagen der Anteil p.i. markierter Zellen in Populationen aus aktivierten Makrophagen wesentlich größer (Histogr. Nr. 6/10 u. Nr. 4/8) .

Dies ist um so erstaunlicher, als durch den höheren Zellgehalt des aus aktivierten Mäusen gewonnenen, zur

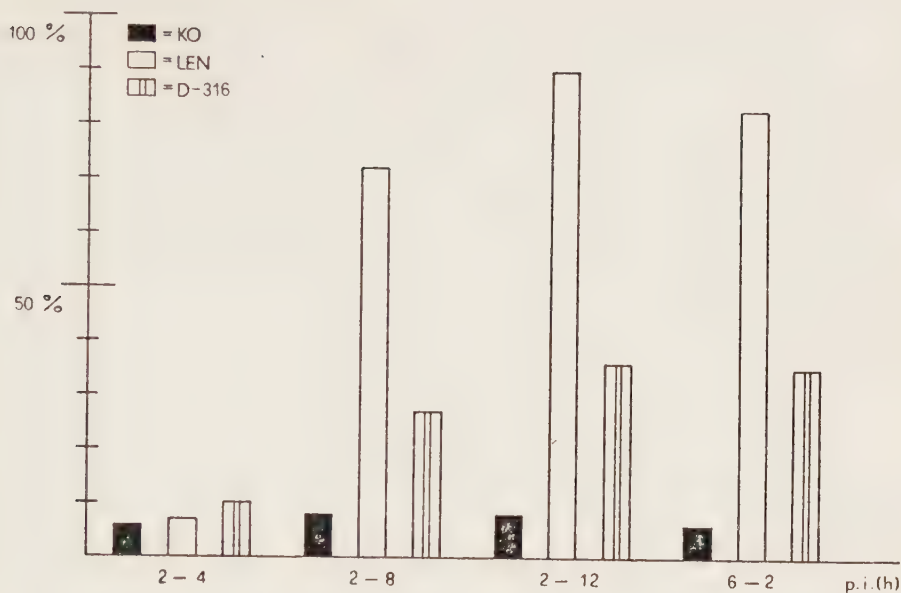
Histogr.Nr. 11

Anteil der überhaupt markierten Zellen in Populationen aus alten aktivierten Makrophagen nach p.i. durchgeführten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer

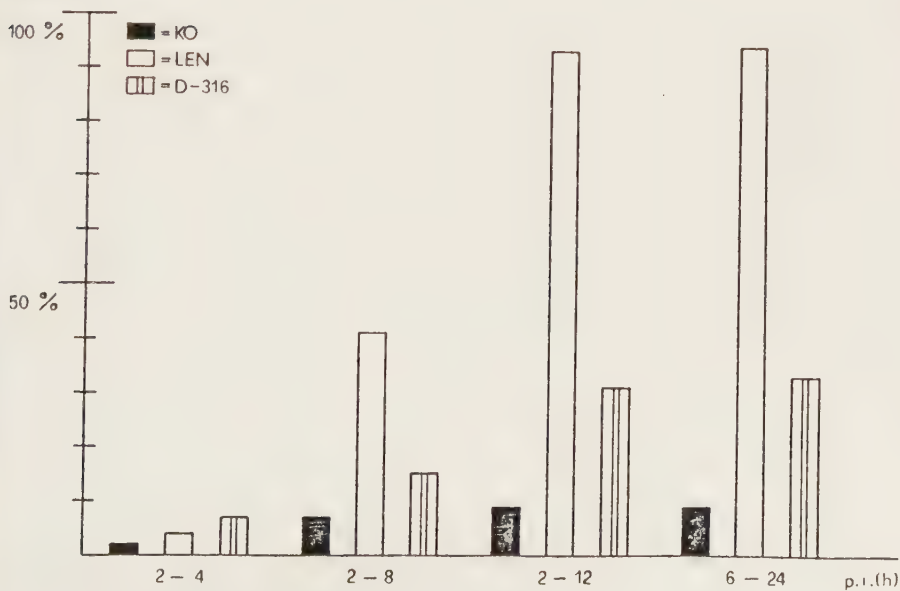
Histogr.Nr. 12

Anteil der überhaupt markierten Zellen in Populationen aus jungen aktivierten Makrophagen nach p.i. durchgeführten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer

Histogr. Nr. 11



Histogr. Nr. 12



Histogr.Nr. 6

Anteil der Zellen mit bis zu 5 SK/Kern in Populationen  
aus jungen aktivierten Makrophagen nach p.i. durchgeführten  
<sup>3</sup>H-Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer

Histogr.Nr. 10

Anteil der Zellen mit mehr als 5 SK/Kern in Populationen  
aus jungen aktivierten Makrophagen nach p.i. durchgeführten  
<sup>3</sup>H-Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer

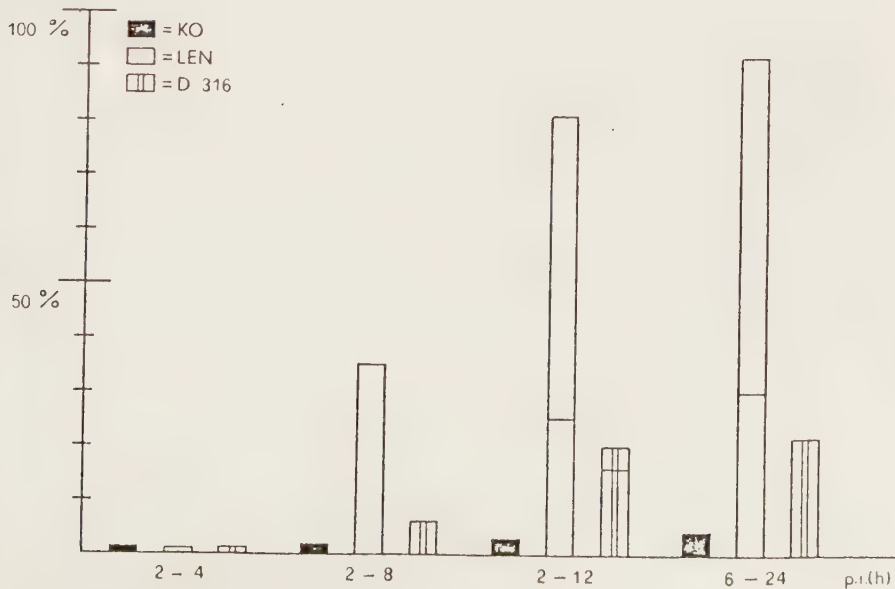
(die Säulen oberhalb des Querbalkens repräsentieren je-  
weils denjenigen Zellanteil, der neben einer Kernmarkierung  
mit mehr als 5 SK/Kern auch gleichzeitig mehr als 5 SK  
über dem Cytoplasma aufweist )

Histogr. Nr. 6

-73-



Histogr. Nr. 10



Histogr.Nr. 4

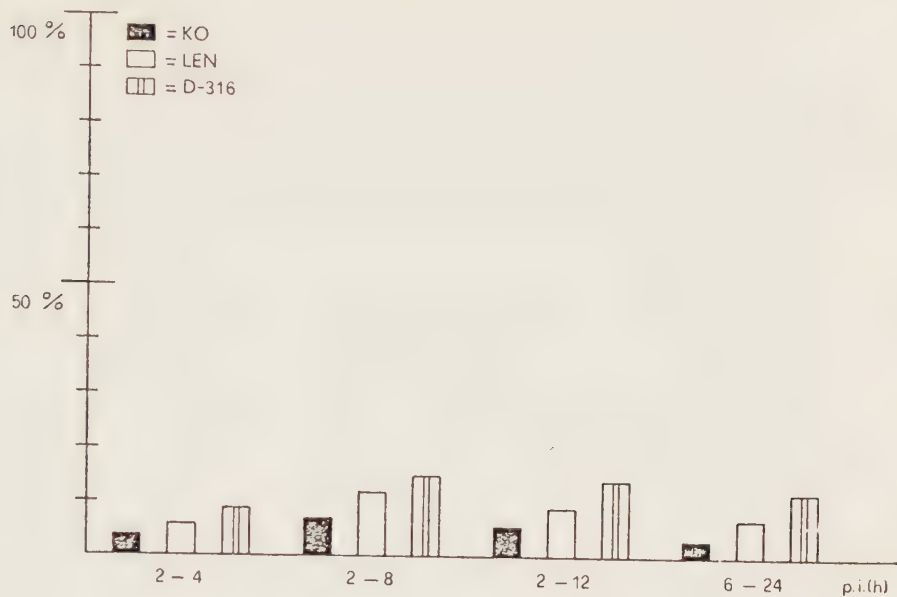
Anteil der Zellen mit bis zu 5 SK/Kern in Populationen aus alten aktivierten Makrophagen nach p.i. durchgeführten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer

Histogr.Nr. 8

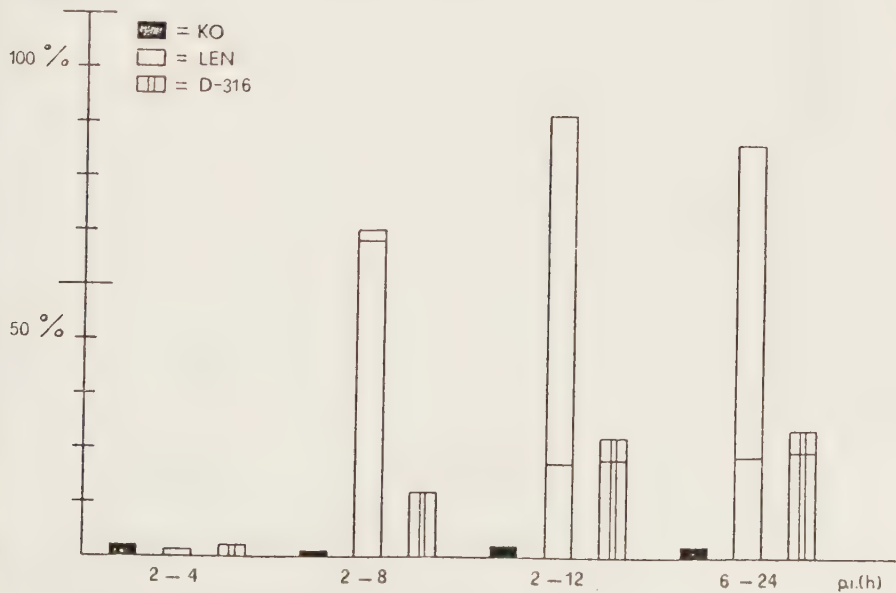
Anteil der Zellen mit mehr als 5 SK/Kern in Populationen aus alten aktivierten Makrophagen nach p.i. durchgeführten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer

(die Säulen oberhalb des Querbalkens repräsentieren jeweils denjenigen Zellanteil, der neben einer Kernmarkierung mit mehr als 5 SK/Kern auch gleichzeitig mehr als 5 SK über dem Cytoplasma aufweist )

Histogr. Nr. 4



Histogr. Nr. 8



Aussaat verwendeten Peritonealexsudats (s.d.a.II.2.) bedingt die Zelldichte in aktivierten Makrophagenkulturen wesentlich über der vergleichbarer normaler Makrophagenkulturen lag, das heißt die Anzahl der pfu pro Makrophage in der Kultur aus aktivierten Makrophagen geringer war.

Z.B. beobachtet man in der Population aus alten Makrophagen nach der Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin 2-8 Std. p.i. 'nur' 56 % über dem Kern markierte Zellen (Histogr.Nr. 1), während der Anteil über dem Kern markierter Zellen in Populationen aus aktivierten alten Makrophagen nach Inkubation 2-8 Std. p.i. 72 % beträgt (Histogr.Nr. 11). Dieser Unterschied wird beim Vergleich des Anteils markierter Zellen nach Inkubation 2-12 Std. p.i. noch deutlicher. Populationen aus alten aktivierten Makrophagen zeigen dann 90 % markierte Zellen (Histogr.Nr. 11), während alte normale Makrophagenkulturen 'nur' einen Anteil von 47 % markierte Zellen zeigen (Histogr.Nr. 1). (Für die anderen Makrophagenpopulationen gilt im Vergleich entsprechendes.)

Die Population aus aktivierten Makrophagen ist in bezug auf die Induzierbarkeit von DNA-Synthese durch die Infektion mit HSV in ihren Mitgliedern homogener geworden. Die einzelnen Zellen erscheinen weniger 'resistent'. Dieser Effekt ist vor allem in mit HSV-Lennette infizierten Makrophagenkulturen sichtbar.

In mit HSV-D-316 infizierten Kulturen aus aktivierten Makrophagen wird vor allem eine höhere DNA-Syntheserate pro Zelle induziert, was sich in einem höheren Anteil stark über dem Kern markierter Zellen zeigt (Histogr. Nr. 9, 10, 7, 8).

Dafür, daß die Aktivierung die Makrophagenpopulationen in Bezug auf die Induzierbarkeit einer DNA-Synthese durch die Infektion 'homogenisiert' hat, spricht auch



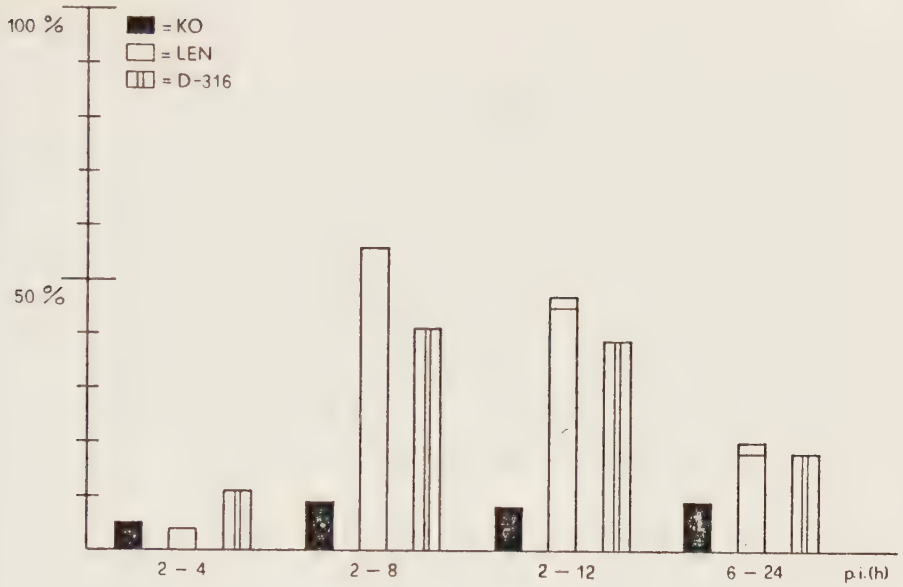
Histogr.Nr.1

Anteil der überhaupt markierten Zellen in Populationen aus alten Makrophagen nach p.i. durchgeführten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer

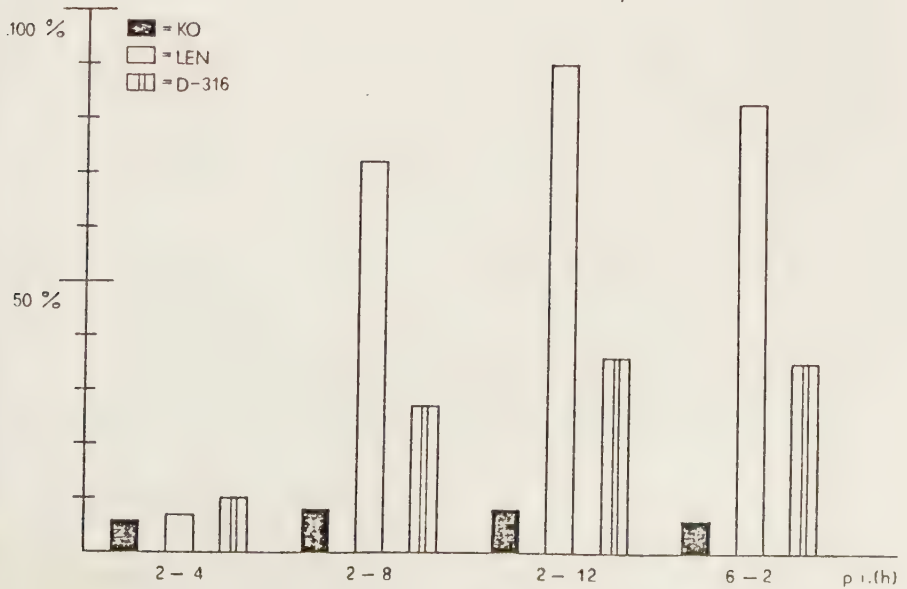
Histogr.Nr. 11

Anteil der überhaupt markierten Zellen in Populationen aus alten aktivierten Makrophagen nach p.i. durchgeführten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer

Histogr. Nr. 1



Histogr. Nr. 11



der nicht mehr feststellbare Unterschied zwischen Populationen aus alten und jungen Makrophagen in Hinblick auf den Anteil markierter Zellen p.i. ::

Populationen aus alten normalen Makrophagen zeigen einen größeren Anteil p.i. markierter Zellen als Populationen aus jungen normalen Makrophagen (Histogr.Nr. 1 u. 2 ), ein Unterschied der bei aktivierten Makrophagen nicht mehr festzustellen ist (Histogr.Nr. 11 u. 12 ).

Die Infektion mit HSV-D-316 führt im Vergleich zu der Infektion mit HSV-Lennette auch in Populationen aus aktivierten Makrophagen zu einer wesentlich geringeren Zahl markierter Zellen p.i. (Histogr.Nr. 11 u. 12 ) .

Die durch die Infektion mit HSV pro Zelle induzierte DNA-Synthese ist dabei in aktivierten Makrophagen wesentlich höher, wie der Anteil p.i. stark über dem Kern markierter Zellen zeigt (Histogr.Nr. 7/8 u. 9/10) .

Der Zellverlust durch cytopathischen Effekt nach der Infektion mit HSV ist, wie in Populationen aus normalen Makrophagen, p.i. in derjenigen Kultur am größten, die p.i. die größere Zahl markierter Zellen aufweist (Tab. Nr. 2).

Die Infektion mit HSV-D-316 führt, ähnlich wie in Populationen aus normalen Makrophagen, im Vergleich mit der Infektion mit HSV-Lennette nur zu einem geringen Zellverlust durch cytopathischen Effekt.

HSV-D-316 ist auch in der aktivierten Makrophagenkultur weniger 'cytotoxisch' als HSV-Lennette (s.d.a. Tab.Nr.2). Das Auftreten des cytopathischen Effekts ist in Populationen aus aktivierten Makrophagen nach der Infektion mit HSV-Lennette im Vergleich zu normalen Makrophagen verzögert: in der Population aus normalen Makrophagen finden sich 12 Std. p.i. 30-40 %, 24 Std. p.i. 15-25% Zellen (mit Zellzahl in der nicht infizierten Kontrollkultur = 100 % ) (Tab.Nr. 1); in der Population aus akti-



Histogr.Nr. 7

Anteil der Zellen mit mehr als 5 SK/Kern in Populationen aus alten Makrophagen nach p.i. durchgeführten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer.

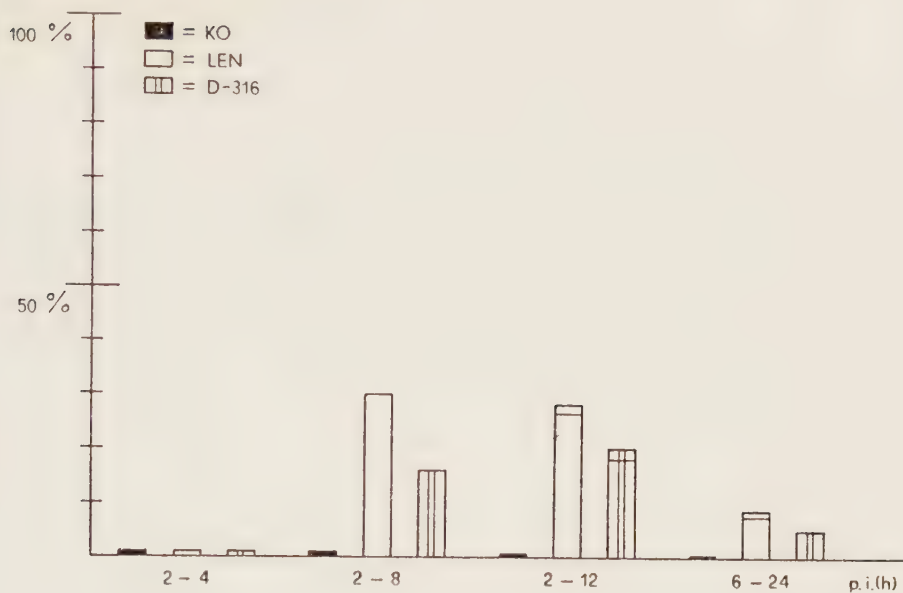
(die Säulen oberhalb des Querbalkens repräsentieren jeweils denjenigen Zellanteil, der neben einer Kernmarkierung mit mehr als 5 SK/Kern auch gleichzeitig mehr als 5 SK über dem Cytoplasma aufweist )

Histogr.Nr. 8

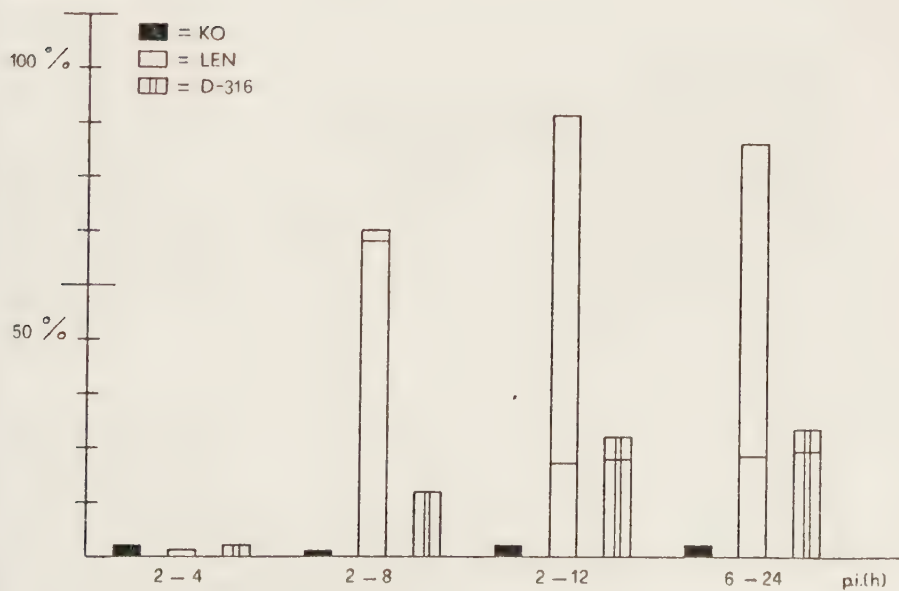
Anteil der Zellen mit mehr als 5 SK/Kern in Populationen aus alten aktivierten Makrophagen nach p.i. durchgeführten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer

(die Säulen oberhalb des Querbalkens repräsentieren jeweils denjenigen Zellanteil, der neben einer Kernmarkierung mit mehr als 5 SK/Kern auch gleichzeitig mehr als 5 SK über dem Cytoplasma aufweist )

Histogr. Nr. 7



Histogr. Nr. 8



Histogr.Nr. 9

Anteil der Zellen mit mehr als 5 SK/Kern in Populationen aus jungen Makrophagen nach p.i. durchgeführten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer

Histogr.Nr. 10

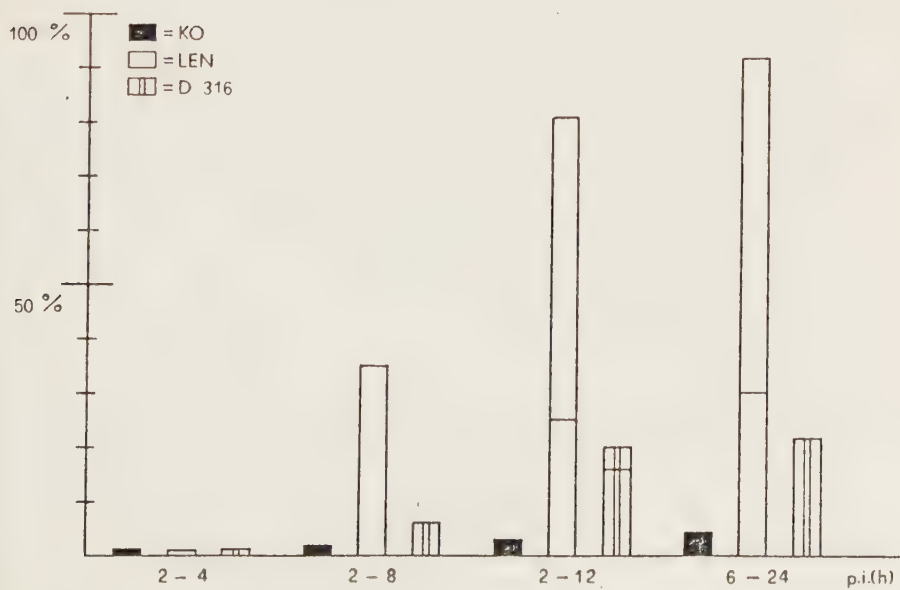
Anteil der Zellen mit mehr als 5 SK/Kern in Populationen aus jungen aktivierten Makrophagen nach p.i. durchgeführten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer

(die Säulen oberhalb des Querbalkens repräsentieren jeweils denjenigen Zellanteil, der neben einer Kernmarkierung mit mehr als 5 SK/Kern auch gleichzeitig mehr als 5 SK über dem Cytoplasma aufweist )

Histogr. Nr. 9



Histogr. Nr. 10



vierten Makrophagen finden sich 12 Std. p.i. 68-78 % und 24 Std. p.i. 4-10 % der ursprünglichen Zellen (Tab. Nr. 2 ) .

In der Population aus aktivierten Makrophagen ist der cytopathische Effekt nach der Infektion mit HSV verzögert, führt insgesamt aber zu einem größeren Zellverlust.

Wie bei normalen Makrophagen sind die meisten cytopathisch veränderten Zellen auch markiert. Nur vereinzelt finden sich cytopathisch veränderte Zellen ohne Markierung.

Verfolgt man die Zu- und Abnahme der Zahl der markierten Makrophagen p.i. fällt beim Vergleich mit Populationen aus normalen Makrophagen auf, daß die dort feststellbare Abnahme der Zahl der p.i. markierten Zellen nach längeren Inkubationszeiten p.i. bei aktivierten Makrophagen ausbleibt. Neben einem verzögerten cytopathischen Effekt als Ursache, der p.i. markierte Zellen auf den Deckgläsern beläßt, sodaß diese in die Auswertung eingehen können, ist auch dies ein Hinweis auf die durch die Aktivierung erfolgte 'Homogenisierung' der Makrophagenpopulation: der Zellpool in der eine Infektion die DNA-synthese induzieren kann ist in der Population aus aktivierten Makrophagen größer (Histogr. Nr. 1/2 u. 11/12 ).

#### Cytoplasmatische Markierung p.i.

Wie aus den Histogrammen Nr. 8 und Nr. 10 hervorgeht, zeigt ein großer Anteil Zellen in Populationen aus aktivierten Makrophagen nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin 2-12 Std. und 6-24 Std. p.i. bei gleichzeitiger Kernmarkierung mehr als 5 SK über dem Cytoplasma. Bei alten aktivierten Makrophagen beobachtet man schon 2-8 Std. p.i. 2 % Zellen mit mehr als 5 SK über dem Cytoplasma bei gleichzeitiger Kernmarkierung (Histogr. Nr. 8; Abb. Nr. 15).

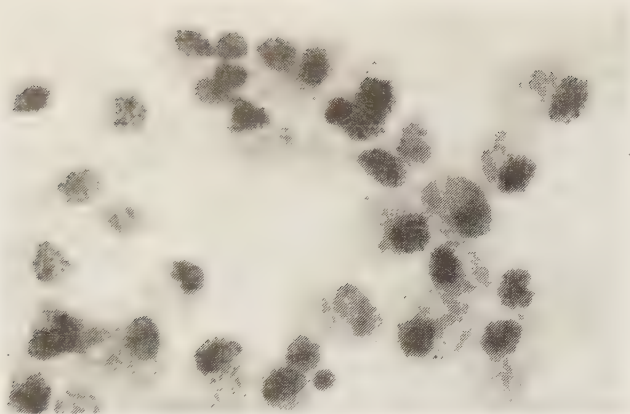


Abb.Nr.14 'Alte' aktivierte Makrophagen nach Infektion mit HSV-Lennette und Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin 2 bis 8 Std. p.i.; über vielen Zellen erkennt man eine deutliche Kernmarkierung, deren Dichte aber nicht der über nicht infizierten Makrophagen auftretenden Kernmarkierung entspricht (Abb.Nr.10)

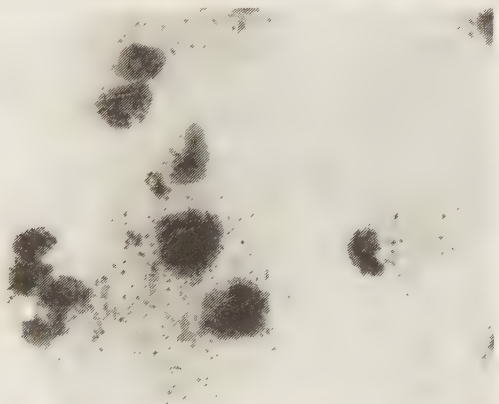


Abb.Nr.15 'Junge' aktivierte Makrophagen nach Infektion mit HSV-Lennette und Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin 2 bis 12 Std. p.i.; neben zweikernigen 'Riesenzellen' ist jetzt über Zellen mit starker Kernmarkierung auch eine cytoplasmatische Markierung zu beobachten

In den nicht infizierten Kontrollen beobachtet man keine Makrophagen mit cytoplasmatischer Markierung.

Ebenso findet man keine Makrophagen mit dieser cytoplasmatischen Markierung, welche nicht gleichzeitig eine Markierung des Kerns aufweisen.

Alle Makrophagen, die mit mehr als 5 SK über dem Cytoplasma markiert sind, haben gleichzeitig auch immer mehr als 5 SK/Kern (Histogr. 8 u. 10).

Der Anteil gleichzeitig stark über dem Kern und Cytoplasma markierter Zellen ist nach der Infektion mit HSV-Lennette wesentlich größer als nach der Infektion mit HSV-D-316 (Histogr. Nr. 8 u. 10) .

Bei allen beträgt die cytoplasmatische Markierung meist immer mehr als 15 SK .

#### Morphologische Besonderheiten

In den Populationen aus aktivierten Makrophagen erscheinen p.i. gehäuft zwei- bis vierkernige Riesenzellen, wobei die Kerne meist markiert sind (Abb.Nr. 15).

Wie bei normalen Makrophagen findet man auch hier nach der Infektion mit HSV-D-316 vermehrt Kernabspaltungen, die auch hier in den meisten Fällen markiert sind.

### III.4.2. MARKIERUNG DURCH $^3\text{H}$ -THYMIN IN NICHT INFIZIERTEN UND MIT HSV INFIZIERTEN BHK-ZELLEN

#### III.4.2.1. KONTROLLEN

In Kulturen aus BHK-Zellen liegt der Anteil über dem Kern markierter Zellen nach  $^3\text{H}$ -Thymidinpulsen von 2,6,10 und 18 Std. Dauer zwischen 27 und 65 % (Histogr.Nr. 13) . Nach einer Inkubationsdauer von 18 Std. (Histogr.Nr. 13 6-24 Std. p.i.) wird mit einem Anteil von dann 65 % markierter Zellen der größte Wert im Vergleich zu den kürzeren Inkubationszeiten erzielt.

Wie aus dem Histogr. Nr. 14 hervorgeht weist der größte Teil der markierten Zellen in der BHK-Zellkultur mehr als 5 SK/Kern auf. Die Zahl der SK/Kern liegt dabei fast immer über 100 SK (s.a. Abb.Nr. 16) .

In der BHK-Zellkultur zeigen viele Zellen eine hohe DNA-Syntheserate.

Mit zunehmender Dauer der  $^3\text{H}$ -Thymidinpulse beobachtet man vermehrt stark über dem Kern markierte Zellen, die sich untereinander in der absoluten Zahl der SK pro Kern unterscheiden (Histogr.Nr. 14) .

Teilungsfiguren und eine Zunahme der absoluten Zellzahl im Verlauf der Beobachtungszeit (0-24 Std.) wurden beobachtet (Tab.Nr. 4) .

#### Tabelle Nr. 4

##### ZUNAHME DER ABSOLUTEN ZELLZAHL MIT DER ZEIT

| Zellart     | Präparat Nr.                                                        | Zeitpunkt       | Zellzahl |
|-------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------|----------|
| BHK-Ko      | 1                                                                   | 0               | 100 %    |
| BHK-Ko      | 2                                                                   | nach 12 Stunden | 225 %    |
| Makrophagen | keine feststellbare Zunahme der Zellzahl<br>in der Beobachtungszeit |                 |          |

(Auswertung, wie unter II.10 beschrieben)

Histogr.Nr. 13

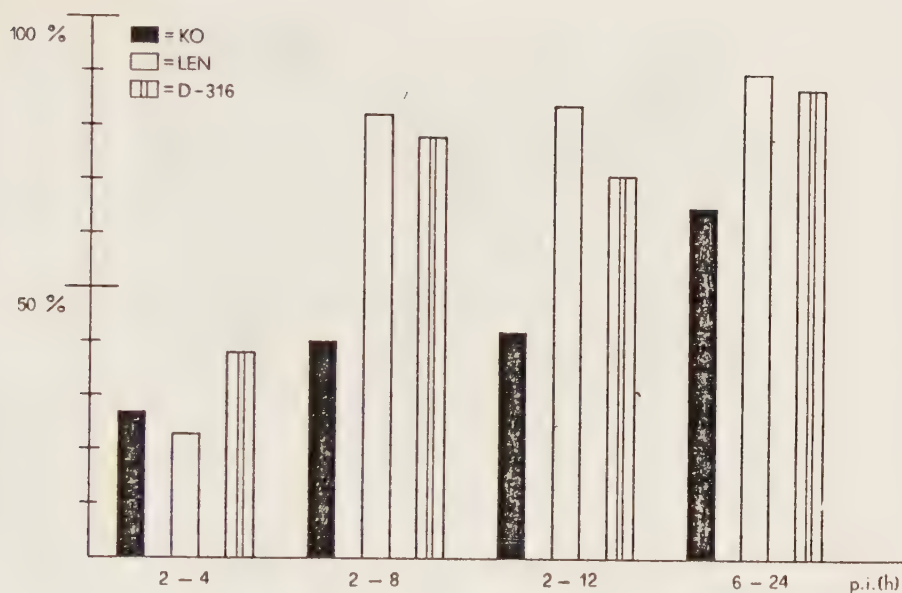
Anteil der überhaupt markierten Zellen in BHK-Zellkulturen nach p.i. durchgeführten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer

Histogr.Nr. 14

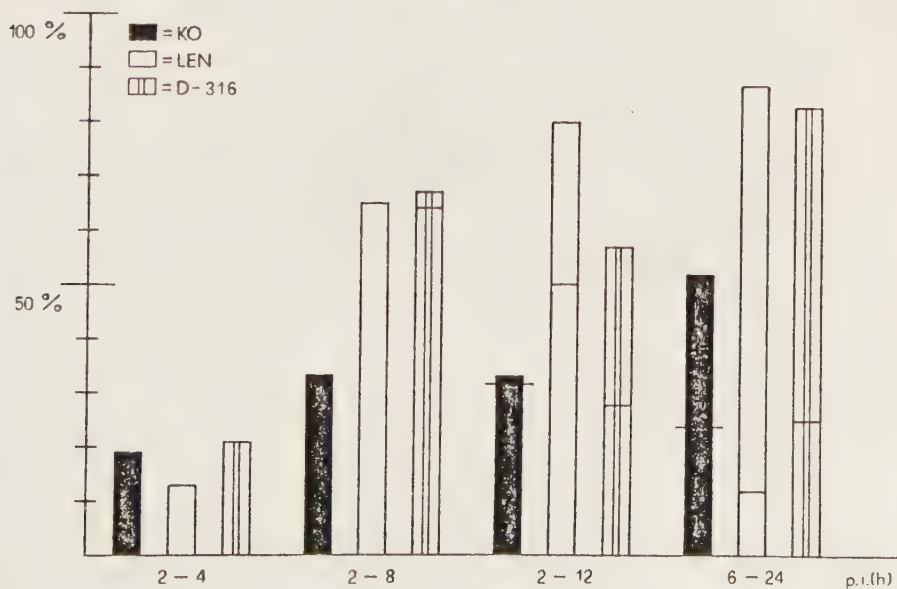
Anteil der Zellen mit mehr als 5 SK/Kern in BHK-Zellkulturen nach p.i. durchgeführten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen unterschiedlicher Dauer

( die Säulenteile oberhalb des Querbalkens repräsentieren jeweils denjenigen Zellanteil, der neben einer Kernmarkierung mit mehr als 5 SK/Kern auch gleichzeitig mehr als 5 SK über dem Cytoplasma aufweist )

Histogr. Nr. 13



Histogr. Nr. 14



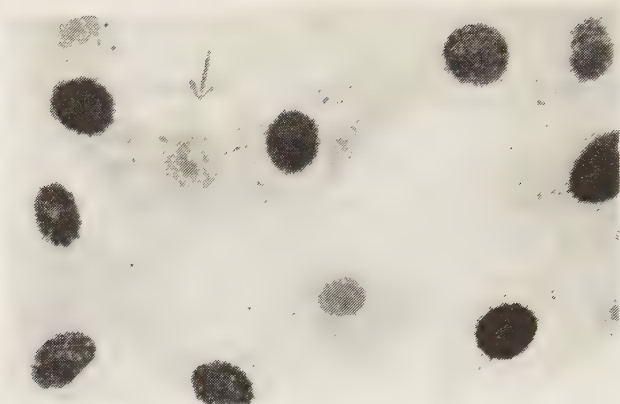


Abb.Nr.16 BHK-Zellen nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin über 18 Stunden (6-24); trotz des Backgrounds sieht man deutlich eine cytoplasmatische Markierung, sogar über Zellen ohne Kernmarkierung (Pfeil)



Abb.Nr.17 Mit HSV-Lennette infizierte BHK-Zellen nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin 6 bis 24 Std. p.i. ;neben der Riesenzellbildung tritt jetzt eine außerordentlich starke cytoplasmatische Markierung auf

### Cytoplasmatische Markierung

Wie das Histogramm Nr.14 zeigt, beobachtet man bei Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin über 10 Std. (2-12 Std) und noch mehr bei Inkubation über 18 Std. (6-24 Std.) in BHK-Kulturen Zellen, die neben einer Kernmarkierung mit mehr als 5 SK auch gleichzeitig mehr als 5 SK über dem Cytoplasma aufweisen. Diese cytoplasmatische Markierung beträgt i.d.R. um 15 SK.

Sie ist im Vergleich zu der über infizierten BHK-Zellen auftretenden cytoplasmatischen Markierung sehr diskret (Abb.Nr. 16 u. 17 ) und unterscheidet sich hinsichtlich der SK-Zahl und Verteilung von der über infizierten aktivierten Makrophagen auftretenden cytoplasmatischen Markierung (Abb.Nr. 15 ) .

### III.4.2.2. MIT STAMM 'LENNETTE' UND STAMM 'D-316' INFIZIERTE BHK-ZELLEN

Nach der Infektion mit HSV steigt auch in der BHK-Zellkultur der Anteil über dem kern markierter Zellen ab der 4. Std. p.i. stark an (Histogr.Nr. 13).

Der größte Teil der p.i. markierten Zellen weist dabei mehr als 5 SK/Kern auf (Histogr.Nr. 14).

Im Vergleich zu der über mit HSV infizierten Makrophagen p.i. auftretenden Kernmarkierung ist die SK-Zahl/Kern über den p.i. markierten BHK-Zellen wesentlich höher, wie die Abbildungen Nr. 17 und Nr. 8 zeigen.

Die Infektion mit HSV induziert in vielen Zellen einer BHK-Kultur eine hohe DNA-Syntheserate.

Aus den vorliegenden Untersuchungsergebnissen selbst läßt sich direkt nur folgern, daß z.B. bei Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin von der 2 bis zur 8 Std. p.i. nur in 42 % der mit HSV-Lennette infizierten Kulturen bzw. 37 % der mit HSV-D-316 infizierten Kulturen eine 'sicher' virusinduzierte DNA-Synthese im Inkubationszeitraum abgelaufen ist,

da ja der Anteil DNA-Synthese zeigender Zellen der nicht infizierten Kontrollpopulationen eigentlich von diesem p.i. markierten Anteil abgezogen werden muß.

Wie unter III.5.1. beschrieben, ist aber in allen nach der Infektion mit HSV markierten Zellen mit einer virusinduzierten DNA-Synthese zu rechnen.

Nur etwa 10 % der Zellen einer BHK-Zellkultur sind unter der Voraussetzung, daß mit einer ausreichenden Menge pfu infiziert wurde für die Induktion einer DNA-Synthese durch die Infektion mit HSV nicht empfänglich, wie die 10 % nicht markierten Zellen nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin 6-24 Std. p.i. zeigen (Histogr.Nr. 13 ).

Der Anteil markierter Zellen nach Infektion mit HSV-D-316 ist gegenüber dem Anteil markierter Zellen nach Infektion mit HSV-Lennette nur unwesentlich verringert.

Der diesbezüglich bei Makrophagen beobachtete Unterschied tritt in BHK-Kulturen also nicht mehr auf.

Trotz der relativ großen Zahl BHK-Zellen, die p.i. eine virusinduzierte DNA-Synthese aufweisen, ist der Zellverlust durch cytopathischen Effekt geringer als in den entsprechend mit HSV infizierten Makrophagenkulturen (Tab.Nr. 3 ).

Zwar sind fast alle Zellen der mit HSV infizierten BHK-Zellkultur 24 Std. p.i. cytopathisch verändert, wie die Abb.Nr. 24 zeigt. Die Zellen verbleiben aber auch nach der abschließenden Waschung auf dem Deckgläschen und gehen so in die Auswertung ein.

Wie der Anteil der 8 Std. p.i. markierten Zellen zeigt, ist in einem großen Teil der BHK-Zellen eine frühe Induktion der DNA-Synthese durch die virale Infektion möglich (Histogr.Nr. 13 ) .

### Cytoplasmatische Markierung

In mit HSV-D-316 infizierten BHK-Kulturen findet man schon bei Inkubation in  $^3\text{H}$ -Thymidin 2-8 Std. p.i. 3 % Zellen, die neben mehr als 5 SK/Kern auch mehr als 5 SK über dem Cytoplasma aufweisen (Histogr.Nr. 14).

So markierte Zellen beobachtet man in verstärktem Maße nach Inkubation 2-12 und 6-24 Std. p.i. sowohl in mit HSV-Lennette infizierten als auch in mit HSV-D-316 infizierten BHK-Zellkulturen (Histogr.Nr. 14) .

Die nach der Infektion auftretende cytoplasmatische Markierung beträgt fast immer mehr als 60 SK und ist damit höher als die in den BHK-Kontrollen oder über infizierten Makrophagen auftretende cytoplasmatische Markierung.

### Morphologische Besonderheiten

In den mit HSV-infizierten BHK-Kulturen beobachtet man markierte Riesenzellen mit mehreren Kernen.

III.4.3. MARKIERUNG DURCH  $^3\text{H}$ -URIDIN IN NICHT INFIZIERTEN  
UND MIT HSV INFIZIERTEN MAKROPHAGEN AUS NMRI-  
MÄUSEN

Getestet wurden Makrophagen aus 12 Wochen alten Mäusen,  
also 'alte' Makrophagen.

III.4.3.1. MARKIERUNG DURCH  $^3\text{H}$ -URIDIN IN NORMALEN NICHT  
INFIZIERTEN UND MIT HSV INFIZIERTEN NMRI-MAKRO-  
PHAGEN

III.4.3.1.1. KONTROLLEN

In den Populationen aus alten Makrophagen beobachtet man  
nach 1 Stunden-Pulsen mit  $^3\text{H}$ -Uridin zwischen 63 % und 83 %  
markierte Zellen in einem Beobachtungszeitraum von 23 Std.  
(Diagr.Nr. 15 ).

Mehr als 5 SK über dem Kern weisen dabei zwischen 42 - 82%  
der Zellen auf (Diagr.Nr. 17 ) .

Die durchschnittliche SK-Zahl beträgt um 10-15 SK in diesen  
stark markierten Zellen.

Verfolgt man die Zahl der markierten Zellen im Beobachtungs-  
zeitraum stellt man fest, daß sich vom Beobachtungsbeginn  
( 1 Std im Diagr.Nr. 15 ) bis zum Beobachtungsende (23 Std.  
im Diagr.Nr. 15 ) der Anteil der nach den  $^3\text{H}$ -Uridin-Pulsen  
markierten Zellen in der Makrophagenpopulation zunimmt.

Zu bestimmten Zeiten nach Versuchsbeginn (3-9 Std, 11-19  
Std.;Diagr.Nr. 19 ) zeigt ein größerer Teil der stark über  
dem Kern markierten Makrophagen auch gleichzeitig eine  
cytoplasmatische Markierung mit mehr als 5 SK.

Zwischen 0-2 % der Zellen zeigten eine cytoplasmatische  
Markierung auch ohne gleichzeitige Kernmarkierung.



Diagr.Nr. 15

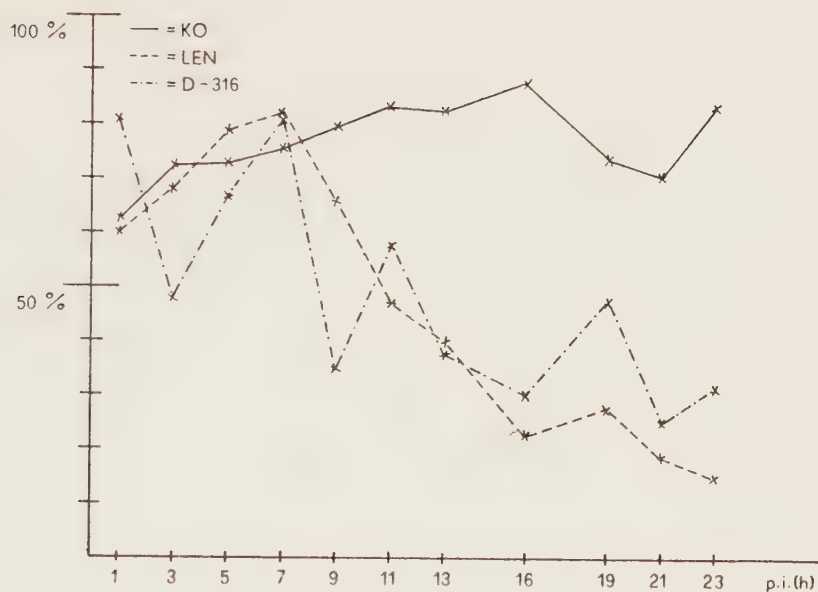
Anteil der überhaupt markierten Zellen in Populationen aus alten Makrophagen nach zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. durchgeführten 1-stündigen  $^3\text{H}$ -Uridin-Pulsen

.

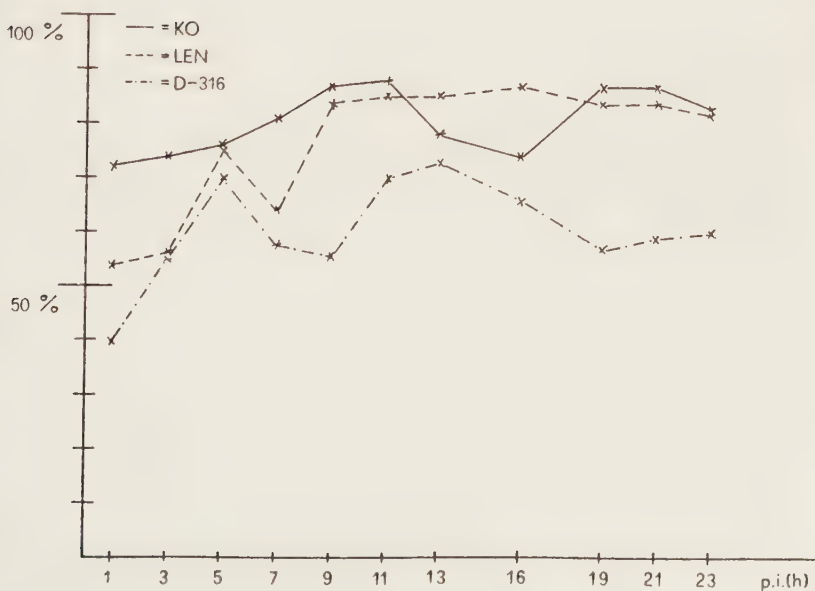
Diagr.Nr. 16

Anteil der überhaupt markierten Zellen in Populationen aus alten aktivierten Makrophagen nach zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. durchgeführten 1-stündigen  $^3\text{H}$ -Uridin-Pulsen

Diagr. Nr. 15



Diagr. Nr. 16



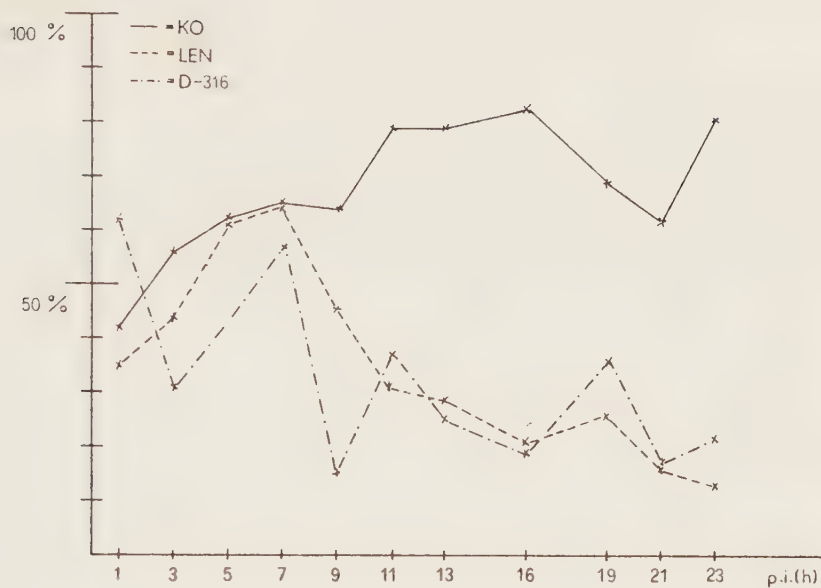
Diagr.Nr. 17

Anteil der Zellen mit mehr als 5 SK/Kern in Populationen aus alten Makrophagen nach zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. durchgeführten 1-stündigen  $^3\text{H}$ -Uridin-Pulsen

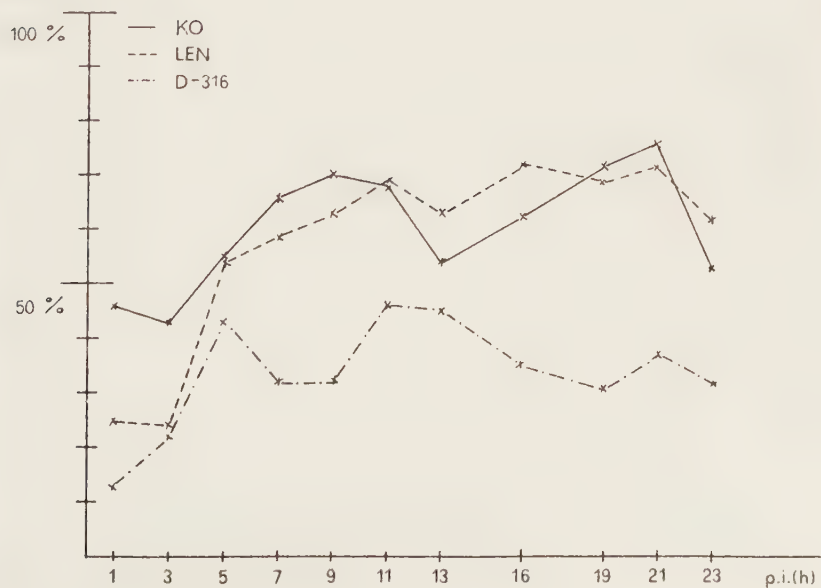
Diagr.Nr. 18

Anteil der Zellen mit mehr als 5 SK/Kern in Populationen aus alten aktivierten Makrophagen nach zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. durchgeführten 1-stündigen  $^3\text{H}$ -Uridin-Pulsen

Diagr. Nr. 17



Diagr. Nr. 18



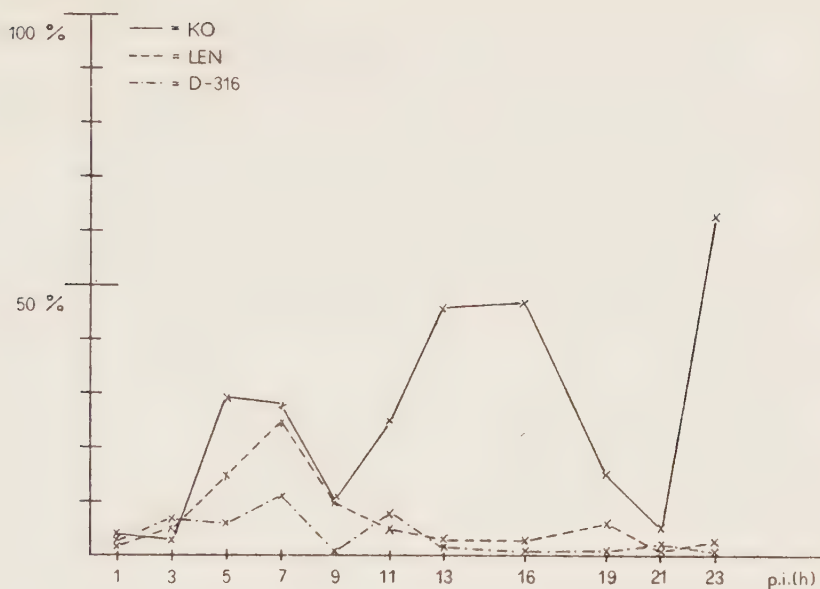
Diagr.Nr. 19

Anteil der Zellen mit mehr als 5 SK/Kern und gleichzeitig mehr als 5 SK über dem Cytoplasma in Populationen aus alten Makrophagen nach zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. durchgeführten 1-stündigen  $^3\text{H}$ -Uridin-Pulsen

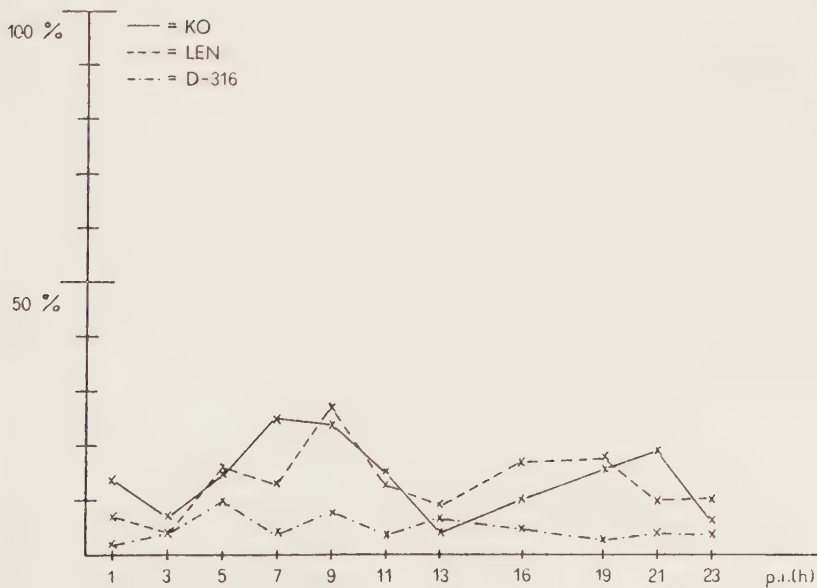
Diagr.Nr. 20

Anteil der Zellen mit mehr als 5 SK/Kern und gleichzeitig mehr als 5 SK über dem Cytoplasma in Populationen aus alten aktivierten nach zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. durchgeführten 1-stündigen  $^3\text{H}$ -Uridin-Pulsen

Diagr. Nr. 19



Diagr. Nr. 20





III.4.3.1.2. MIT STAMM 'LENNETTE' UND STAMM 'D-316'  
INFIZIERTE MAKROPHAGEN

In den ersten 7 Std. p.i. beobachtet man in den mit HSV infizierten Makrophagenpopulationen eine Vergrößerung des Anteils nach  $^3\text{H}$ -Uridin-Pulsen markierter Zellen, ähnlich wie in den Kontrollpopulationen (Diagr.Nr. 15) .

In mit HSV-D-316 infizierten Kulturen ist dabei der Anteil der p.i. stark über dem Kern markierten Zellen etwas geringer als in mit HSV-Lennette infizierten Makrophagenkulturen (Diagr.Nr. 17) .

In den mit HSV-Lennette infizierten Makrophagenkulturen beobachtet man bis zur 7 Std. p.i. auch eine Vergrößerung der Zahl sowohl über dem Kern als auch über dem Cytoplasma markierte Zellen, wie das Diag.Nr. 19 zeigt.

Ab der 7 Std. p.i. verringert sich der Anteil der durch  $^3\text{H}$ -Uridin markierten Zellen in den mit HSV infizierten Kulturen kontinuierlich, wobei kein wesentlicher Unterschied zwischen mit HSV-Lennette oder HSV-D-316 infizierten Kulturen besteht (Diagr.Nr. 15) .

Nach der 7. Std. p.i. bleibt in den mit HSV infizierten Kulturen auch das Auftreten sowohl über dem Kern als auch über dem Cytoplasma markierter Zellen aus (Diagr.Nr.19).

Die Infektion mit HSV hemmt in den meisten Zellen einer Kultur aus alten normalen Makrophagen den  $^3\text{H}$ -Uridin-Einbau ab der 7. Std. p.i. .

III.4.3.2. MARKIERUNG DURCH  $^3\text{H}$ -URIDIN IN AKTIVierten  
NICHT INFIZierten UND MIT HSV INFIZierten  
NMRI-MAKROPHAGEN

III.4.3.2.1. KONTROLLEN

In den Populationen aus alten aktivierten Makrophagen findet man nach 1 Stunden-Pulsen mit  $^3\text{H}$ -Uridin zwischen

71 % und 88 % markierte Zellen in einem Beobachtungszeitraum von 23 Std. (Diagr.Nr. 16 ).

Mehr als 5 SK/Kern zeigen dabei zwischen 46 % und 76 % der Zellen ( Diagr.Nr. 18) .

Von der 5. bis 11. Std. nach Versuchsbeginn und von der 16. bis 23. Std. nach Versuchsbeginn zeigt ein Teil der Zellen neben einer Kernmarkierung mit mehr als 5 SK/Kern auch eine starke cytoplasmatische Markierung nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Uridin (Diagr.Nr. 20) .

Nur vereinzelt kann man Zellen beobachten, die ohne eine Markierung des Kerns zu haben, eine cytoplasmatische Markierung aufweisen.

Auch in den Populationen aus aktivierten Makrophagen ist nach Versuchsbeginn eine Vergrößerung des Anteils der nach  $^3\text{H}$ -Uridin-Pulsen markierten Zellen im weiteren Verlauf des Beobachtungszeitraums festzustellen ( Diagr.Nr. 16 ) .Dieses Phänomen zeigt sich vor allem in einer Vergrößerung der Zellen mit starker Kernmarkierung (Diagr.Nr. 18 ).

Vergleicht man den Anteil der stark über dem Kern markierten Zellen (Diagr.Nr. 17/18) und den Anteil der sowohl über dem Kern als auch über dem Cytoplasma stark markierten Zellen (Diagr.Nr. 19/20 ) in den Populationen aus normalen alten und aktivierten alten Makrophagen, so zeigt sich, daß die Aktivierung auf die einzelne Zelle bezogen keine Steigerung der  $^3\text{H}$ -Uridin-Inkorporation bewirkt, sondern die RNA-Syntheserate eher vermindert.

#### III.4.3.2.2. MIT STAMM 'LENNETTE' UND STAMM 'D-316' INFIZIERTE MAKROPHAGEN

Wie aus dem Diagramm Nr. 16 hervorgeht, liegt in den ersten Stunden p.i. der Anteil der markierten Zellen nach  $^3\text{H}$ -Uridin-Pulsen von 1 Std. Dauer in den mit HSV infizierten Populationen aus alten aktivierten Makrophagen wesentlich unter dem der entsprechenden Kontrolle (Diagr.Nr. 16, 1-5 Std. p.i. ) .

Wie aus dem Diagr.Nr. 18 hervorgeht, wird bei aktivierten Makrophagen durch die Infektion mit HSV zunächst vor allem der Anteil der stark über dem Kern markierten Zellen vermindert (Diagr.Nr. 18, 1-5 Std. p.i. ) .

In der Population aus aktivierten Makrophagen hemmt die Infektion mit HSV initial in einem großen Teil der Zellen den Einbau von  $^3\text{H}$ -Uridin.

In Populationen aus normalen alten Makrophagen ist dieses Phänomen nicht so deutlich.

Nach der 1 Stunde p.i. steigt der Anteil RNA-Synthese zeigender Zellen in der Population aus alten aktivierten Makrophagen aber wieder an (Diagr.Nr. 16 ).

In der mit HSV-Lennette infizierten Makrophagenkultur wird sogar in der Folge ein gleich hoher Anteil durch  $^3\text{H}$ -Uridin markierter Zellen erreicht wie in den nicht infizierten Populationen aus aktivierten Makrophagen (Diagr.Nr. 16 ). Auch die dann auftretende Zahl gleichzeitig stark über dem Kern und Cytoplasma markierter Zellen unterscheidet sich in der mit HSV-Lennette infizierten Makrophagenkultur aus aktivierten Makrophagen nicht von der in der entsprechenden Kontrolle auftretenden Zahl markierter Zellen (Diagr. Nr. 20) .

In der mit HSV-D-316 infizierten Population bleibt zwar der Anteil der nach  $^3\text{H}$ -Uridin-pulsen markierten Zellen auch im weiteren Infektionsverlauf unter dem der entsprechenden Kontrolle (Diagr.Nr. 18 ), aber es finden sich auch hier im Vergleich zu Populationen aus normalen alten Makrophagen wesentlich mehr Zellen die p.i. noch eine RNA-Synthese aufweisen.

Die Aktivierung der Makrophagen hat als Folge, daß in einem großen Anteil der Zellen einer Population aus aktivierten Makrophagen auch nach der Infektion mit HSV eine  $^3\text{H}$ -Uridin-Inkorporation über die 7.Std. p.i. hinaus festzustellen ist.

### III.5.

### DISKUSSION

#### III.5.1. IST DIE NACH $^3\text{H}$ -THYMINIDIN-PULSEN AUFTRETENDE KERNMARKIERUNG IN MIT HSV INFIZIERTEN ZELLEN AUSDRUCK VIRALER ODER ZELLULÄRER DNA-PRODUKTION

Das zu einer Zellkultur zugegebene  $^3\text{H}$ -Thyminidin wird fast ausschließlich in DNA eingebaut (3,18,87) und führt deshalb zu einer spezifischen Markierung neugebildeter DNA (3,18,87) .

Für die in den nicht infizierten Makrophagen- und BHK-Kulturen nach  $^3\text{H}$ -Thyminidin-Pulsen auftretende Kernmarkierung kann deshalb angenommen werden, daß diese durch den Einbau des zur Verfügung gestellten  $^3\text{H}$ -Thyminidin im Rahmen einer zellulären DNA-Synthese zustande gekommen ist. Die nach den  $^3\text{H}$ -Thyminidin-Pulsen markierten Zellen zeigen, daß in ihnen im Inkubationszeitraum die Synthese zellulärer DNA erfolgte.

Nach der Infektion mit HSV steigt der Anteil über dem Kern markierter Zellen nach entsprechenden  $^3\text{H}$ -Thyminidin-Pulsen sowohl in den Kulturen aus normalen Makrophagen als auch in denen aus aktivierten und in BHK-Zellkulturen wesentlich.

Hierfür sind grundsätzlich zwei Mechanismen denkbar :

- A. Die Infektion mit HSV induziert die Synthese von zellulärer DNA in solchen Makrophagen und BHK-Zellen, die ohne Infektion keine zelluläre DNA-Synthese zeigen und/oder steigert in zelluläre DNA-Synthese zeigenden Zellen die Syntheserate
- B. Der nach der Infektion mit HSV festgestellte Anstieg des Anteils der Zellen mit Kernmarkierung beruht auf der Synthese viraler DNA im Rahmen von in den Zellen ablaufenden Vermehrungszyklen des HSV.  
Durch die Infektion mit HSV 'induzierte' DNA-Synthese

ist mit der Bildung viraler DNA im Inkubationszeitraum gleichzusetzen.

Daneben ergibt sich die Frage, ob alle Zellen, die p.i. markiert sind, nur virale DNA gebildet haben oder ob in dieser p.i. nach  $^3\text{H}$ -Thymidin markierten Zellfraktion auch noch Zellen mit rein zellulärer DNA-Synthese sind.

Die durchgeführten autoradiographischen Untersuchungen ergeben, wie im Folgenden dargestellt, einige Anhaltspunkte dafür, daß durch die Infektion mit HSV induzierte DNA-Synthese mit der Bildung viraler DNA gleichzusetzen ist. Die Induktion der zellspezifischen DNA-Synthese durch die Infektion mit HSV erscheint unter diesen Gesichtspunkten unwahrscheinlich.

In Zusammenhang mit anderen Untersuchungen (34, 10, 66, 64, 7, 50, 83) kann geschlossen werden, daß in allen p.i. markierten Zellen unter der Voraussetzung, daß die zu Infektion verwandte Menge pfu ausreichte um alle Zellen zu infizieren, die Markierung durch  $^3\text{H}$ -Thymidin auf der Synthese viraler DNA im Inkubationszeitraum beruht.

1. Verfolgt man die Zu- und Abnahme des Anteils der Zellen mit Kernmarkierung p.i., stellt man eine sprunghafte Vergrößerung dieses Anteils bei Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin im Zeitraum 2-8 Std. p.i. fest.

Bei Inkubation 2-4 Std. p.i. zeigen infizierte Makrophagenpopulationen ähnlich wie infizierte BHK-Zellkulturen nur einen gering größeren bzw. gleichen Anteil Zellen mit Kernmarkierung, wenn man diese mit den entsprechenden nicht infizierten Zellkulturen vergleicht. Der starke Anstieg der Anteils der Zellen mit Kernmarkierung p.i. ist also in der Hauptsache auf eine im Zeitraum 4-8 Std. p.i. in den Zellen beginnende DNA-Synthese zurückzuführen.

Falke und Peterknecht (34) beobachteten in mit HSV infizierten KAN-Zellen einen durch HSV-DNA-Synthese bedingten Anstieg des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbaus nach der 4 Std. p.i. .

Sydiskis und Roizman (83) stellen in mit HSV infizierten HEP-2-Zellen fest, daß der größte Teil der viralen DNA im Zeitraum 4.-7. Std. p.i. synthetisiert wird. In mit PRV - einem Mitglied der Herpesgruppe - infizierten Zellen beobachteten Ben-Porat und Kaplan (7) einen Anstieg der viralen DNA-Synthese bis zur 7.5 Std. p.i. Bittlingmaier et al (10) stellen bei mit HSV infizierten 'faulen' BHK-Zellen einen auf der Synthese viraler DNA beruhenden Anstieg der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation fest.

Die in den vorliegenden Untersuchungen festgestellte Steigerung der DNA-Synthese in den mit HSV infizierten Zellkulturen korreliert demnach zeitlich gut mit einem möglicherweise in den Zellen ablaufendem Vermehrungszyklus des HSV.

2. Würde durch die Infektion mit HSV in den Makrophagen bzw. BHK-Zellen p.i. die Synthese zellulärer DNA induziert, könnte man mit einer p.i. konstant bleibenden, wenn nicht sogar leichten Zellvermehrung rechnen.

Der Anstieg des Anteils der  $^3\text{H}$ -Thymidin inkorporierenden Zellen p.i. ist aber mit einer zeitlich darauf folgenden Abnahme der absoluten Zellzahl in den Zellkulturen verbunden, wie die Auszählungen des Zellverlustes durch 'cytopathischen Effekt' ergeben haben.

Zunächst noch auf dem Deckgläschen haftende cytopathisch veränderte Zellen sind markiert, d.h. haben im Inkubationszeitraum zwar DNA synthetisiert, gehen aber in der Folge trotzdem zugrunde.

Auch diese Ergebnisse lassen eher auf einen viralen Vermehrungszyklus mit der Bildung viraler DNA, cytopathischer Veränderung der Zelle und anschließendem Zelluntergang schließen.

Eine Zellzerstörung und damit Verminderung der Zellzahl in der Kultur durch den radiobiologischen Effekt des inkorporierten  $^3\text{H}$ -Thymidins, wie bei Pollister und Schultze (87) und anderen (18) beschrieben, kommt hier als alleinige

Ursache für die Zellverminderung p.i. nach der Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin nicht in Betracht, da die gegebene Aktivität zu niedrig war um solche Effekte in dem aufgetretenen Maß hervorzurufen.

Whitmore und Gulyas (99) beobachten z.B. nach 1 stündigen  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen und einer spezifischen Aktivität des  $^3\text{H}$ -Thymidins von 6.7 Ci/mmol mit 1 uCi/ml noch 65 % überlebende Zellen in einer Kultur aus L-strain Zellen. Drew und Panter (23) stellen nach einem 3 Std.-Puls mit 2 uCi/ml und einer spezifischen Aktivität des  $^3\text{H}$ -Thymidins von 1.9 Ci/mmol nur eine um 14 % verminderte Überlebensrate in einer Kultur aus HeLa-Zellen fest.

3. Über dem Kern markierte infizierte Zellen zeigen nach längeren  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen zunehmend auch eine cytoplasmatische Markierung, ein Phänomen, das bei aktivierten Makrophagen wesentlich ausgeprägter ist als bei normalen Makrophagen. Das erste Auftreten dieser cytoplasmatischen Markierung ist in mit HSV infizierten Kulturen aus aktivierten Makrophagen nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin 2-8 Std. p.i. festzustellen, tritt aber im wesentlichen erst nach  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkubation von der 2-12 Std. p.i. auf.

Die cytoplasmatische Markierung resultiert also in der Hauptsache aus einem Vorgang, der in den Zellen im Zeitraum 8 bis 12 Std. p.i. abläuft.

Wenn in den Zellen Vermehrungszyklen des HSV ablaufen, wäre in diesem Zeitraum mit dem Übergang größerer Mengen viraler DNA aus dem Kern in den cytoplasmatischen Raum zu rechnen (s.d. III.5.2).

Die Annahme, daß die Kernmarkierung nach  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen in mit HSV infizierten Zellen die Synthese viraler DNA widerspiegelt, ist also auch in diesem Zusammenhang vertretbar und sogar Voraussetzung, wenn man in der der Kernmarkierung folgenden cytoplasmatischen Markierung das Auftreten von viraler DNA im Cytoplasma sieht (s.d. III.5.2.) .

Neben diesen mehr indirekten Hinweisen geht aus Untersuchungen anderer eindeutig hervor, daß eine Steigerung des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbaus in mit HSV infizierten Makrophagen und auch anderen Zellen auf der Produktion viraler DNA beruht. Die p.i. synthetisierte DNA ist virale DNA. So zeigen Frank et al (38) durch Zentrifugation im CsCl-Gradienten, daß die in NMRI-Makrophagen nach der Infektion mit HSV entstandene DNA virale DNA ist. Daneben wird gezeigt, daß eine Vorbehandlung des HSV vor der Infektion mit UV-Licht zu einer Abnahme der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation im Vergleich zu mit unbehandeltem HSV infizierten Makrophagenkulturen führt, was auf den durch die UV-Behandlung gestörten Vermehrungszyklus des HSV zurückgeführt wird (38). Schindling (86) zeigt eine Vermehrung von infektiösen Partikeln in der Kultur aus NMRI-Makrophagen nach der Infektion mit HSV mit Hilfe der Titrationsmethode. Stevens und Cook (90) beobachten elektronenmikroskopisch die Bildung kompletter Viruspartikel in mit HSV infizierten Kulturen aus Mäusemakrophagen. Daneben zeigen auch andere Untersuchungen (7,10,34,50,64,66,83), daß das HSV die zelluläre DNA-Synthese nicht stimuliert sondern hemmt.

Auch ein Vergleich mit der durch SV 40 induzierten zellulären DNA-Synthese in Makrophagen, läßt im vorliegenden Fall eher auf die Synthese herpesspezifischer DNA schließen. Zwar zeigt Defendi et al (21), daß eine Infektion mit SV 40 in Makrophagen die zelluläre DNA-Synthese induziert. Eine Produktion von SV 40 DNA erfolgt nicht (21). Die durch die Infektion mit SV 40 als Folge einer Transformation zu deutende Synthese zellulärer DNA erfolgt aber erst 48 - 60 Std. p.i. und dann in 100 % der Zellen einer Makrophagenkultur (21). Hinzu kommt, daß noch in keinem einzigen Fall der eindeutige Nachweis erbracht werden konnte, daß eine Infektion

von Zellen mit Viren der Herpes-Gruppe, denen eine mögliche onkogene Potenz zugeschrieben wird, zu einer Steigerung der Syntheserate zellulärer Komponenten führt, wie es für andere transformierende Viren demonstriert worden ist (7).

Aus allem ergibt sich, daß die p.i. auftretende Markierung nach der Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin in den mit HSV infizierten NMRI-Makrophagen und BHK-Zellen auf der Synthese viraler DNA im Inkubationszeitraum beruht.

Die durch die Infektion mit HSV induzierte DNA-Synthese ist mit 'viraler DNA-Synthese' gleichzusetzen.

Auf Grund der hohen Infektionsdosis pro Zelle muß nicht damit gerechnet werden, daß in den infizierten Kulturen p.i. noch zelluläre DNA-Synthese zeigende Zellen vorhanden sind.

### III.5.2. ZUM PROBLEM DER CYTOPLASMATISCHEN MARKIERUNG ÜBER NMRI-MAKROPHAGEN UND BHK-ZELLEN NACH $^3\text{H}$ -THYMIDIN-PULSEN

Ein großer Prozentsatz aktivierter Makrophagen und BHK-Zellen und ein kleiner Anteil normaler alter zeigt nach der Infektion mit HSV bei Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin über längere Zeiträume p.i. eine relativ starke cytoplasmatische Markierung neben einer gleichzeitigen starken Kernmarkierung.

Davon unterschieden zeigen nicht infizierte BHK-Zellen nach extrem langen  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen (18 Std) auch eine cytoplasmatische Markierung, die aber diskreter ist als die über infizierten Zellen.

In nicht infizierten Makrophagen wurde eine solche cytoplasmatische Markierung nicht beobachtet.

Als Ursache der relativ ausgeprägten cytoplasmatischen Markierung über den infizierten Zellen p.i. kann, wie unten beschrieben Verschiedenes in Erwägung gezogen

werden. Am ehesten kommt dabei im Cytoplasma liegende virale DNA in Betracht.

Für die über den nicht infizierten BHK-Zellen aufgetretene diskrete cytoplasmatische Markierung sind möglicherweise markierte Proteine, die durch den Einbau der durch Demethylierung von  $^3\text{H}$ -Thymidin abgespaltenen markierten  $\text{CH}_3$ -Gruppe radioaktiv geworden sind, und/oder markierte mitochondriale cytoplasmatische DNA verantwortlich. Dies ergibt sich aus den im Folgenden im einzelnen aufgezeigten Überlegungen.

1. Die ausgeprägte cytoplasmatische Markierung p.i. über mit HSV infizierten Zellen ist Folge von im Cytoplasma vorliegender markierter viraler DNA

Für diese Hypothese sprechen folgende sich aus den Untersuchungen ergebende Befunde :

- A. In nicht mit HSV infizierten Zellpopulationen gibt es keine stark cytoplasmatisch markierten Zellen, d.h. die p.i. über den infizierten Zellen auftretende cytoplasmatische Markierung ist Folge der Infektion.
- B. Einer cytoplasmatischen Markierung geht zeitlich immer eine Markierung des Zellkerns voraus.  
Wie oben beschrieben, beruht die Kernmarkierung über infizierten Makrophagen und BHK-Zellen nach der Infektion mit HSV auf im Inkubationszeitraum gebildeter viraler DNA.
- C. Der Vorgang, der die cytoplasmatische Markierung zur Folge hat, muß im Zeitraum 8 bis 12 Std. p.i. einsetzen, da eine Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin 2-8-Std. p.i. i.d.R. zu keinen cytoplasmatisch markierten Zellen führt, wohl aber eine Inkubation von 2-12 Std. p.i. .  
Die Kernmarkierung über den mit HSV infizierten Zellen beruht auf der Synthese viraler DNA. Verfolgt man das weitere Schicksal der synthetisierten Herpes-DNA, so zeigen andere Untersuchungen (19,66), daß die HSV-DNA

nach ihrer Reduplikation im Kern und teilweisen Einbau in das Capsid im endoplasmatischen Retikulum der Zellen akkumuliert (19,66) .

Der größte Teil der viralen DNA in mit HSV infizierten Zellen wird in der 4-7 Std. synthetisiert (83). Bis zur Bildung von infektiösem Virus sollen nach der DNA-Reduplikation 6-9 Std. vergehen (83).

Mit einer Ausschleusung gebildeter markierter Virus-  
teilchen größeren Umfangs aus dem Kern in das endo-  
plasmatische Retikulum ist also im Zeitraum 10-16 Std.  
p.i. zu rechnen.

Die in den vorliegenden Untersuchungen auftretende cyto-  
plasmatische Markierung tritt genau zu diesem Zeitpunkt  
bzw. in diesem Zeitraum auf.

Im Cytoplasma vorliegende virale DNA als Ursache für  
diese starke cytoplasmatische Markierung anzunehmen  
wäre also auch unter diesem Gesichtspunkt gerechtfertigt.

D: Es gibt keine stark cytoplasmatisch markierten Zellen,  
die nicht gleichzeitig stark über dem Kern markiert sind,  
d.h. eine cytoplasmatische Markierung ist immer mit der  
Produktion großer Mengen viraler DNA verbunden .

So zeigen mit HSV-Lennette infizierte Populationen aus  
aktivierten Makrophagen, in denen in vielen Zellen p.i.  
eine hohe Syntheserate viraler DNA zu beobachten ist,  
viele Zellen nach längeren <sup>3</sup>H-Thymidin-Pulsen p.i. auch  
eine cytoplasmatische Markierung. Viel markierte virale  
DNA kann ins Cytoplasma übertreten.

Dagegen tritt in mit HSV-Lennette infizierten Populationen  
aus normalen jungen Makrophagen, in denen damit verglichen  
in weniger Zelle p.i. virale DNA synthetisiert wird und  
die Syntheserate pro Zelle niedriger ist, eine cytoplasmatische  
Markierung nicht auf.

Auch der Vergleich HSV-Lennette infizierter Zellpopulationen  
mit HSV-D-316 infizierten Zellpopulationen zeigt, daß ein  
Zusammenhang zwischen der im Kern gebildeten viralen DNA

und einer folgenden cytoplasmatischen Markierung besteht.

In mit HSV infizierten Makrophagenpopulationen, in denen die Infektion mit D-316 im Vergleich zur Infektion mit HSV-Lennette nur in wenigen Zellen eine niedrige Syntheserate viraler DNA induziert, finden sich in der mit HSV-D-316 infizierten Kultur p.i. auch weniger gleichzeitig über dem Kern und Cytoplasma markierte Zellen.

In infizierten BHK-Zellkulturen aber, in denen sowohl die Infektion mit HSV-Lennette als auch die Infektion mit HSV-D-316 in einem fast gleichen Anteil der Zellen einer Kultur die Synthese viraler DNA induzieren, besteht auch kein wesentlicher Unterschied in der Zahl der nach längeren  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen p.i. gleichzeitig über dem Kern und Cytoplasma markierten Zellen. In BHK-Zellen können sich sowohl große Mengen HSV-Lennette DNA als auch HSV-D-316 DNA vermehren, sodaß eine Ausschleusung ins Cytoplasma in beiden Fällen auch zu einer entsprechenden cytoplasmatischen Markierung führt.

2. Die cytoplasmatische Markierung p.i. ist die Folge markierter Thymidinabbauprodukte, die im Rahmen des  $^3\text{H}$ -Thymidinkatabolismus in den Zellen entstanden sind und/oder im Cytoplasma vorliegender mitochondrialer DNA

Eine cytoplasmatische Markierung nach Inkubation mit Methyl- $^3\text{H}$ -Thymidin kann ihre Ursache grundsätzlich auch in dem Auftreten markierter Substanzen haben, die durch den Einbau radioaktiver Abbauprodukte des Methyl- $^3\text{H}$ -Thymidins im Rahmen des Zellstoffwechsels markiert wurden oder selbst noch radioaktive Abbauprodukte des  $^3\text{H}$ -Methyl-Thymidins sind (18,87) .

So ist bekannt, daß nach Umwandlung des Thymidins über Dihydrothymidin und  $\beta$ -Ureidoisobuttersäure zur  $\beta$ -Aminoisobuttersäure nach Demethylierung die  $^3\text{H}$ -haltige

Methylgruppe über ihren Einbau in Aminosäuren letztendlich zu markierten Proteinen führen kann (18,87) . Auch eine direkte Demethylierung des Methyl- $^3\text{H}$ -Thymidins mit Auftreten einer dem Zellstoffwechsel zur Verfügung stehenden markierten  $\text{CH}_3$ -Gruppe ist, ebenso wie das Auftreten markierter RNA nach Incubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin, möglich (16,87,35,79,80) .

Da auch im Inkubationsmedium selbst Abbauprodukte des  $^3\text{H}$ -Thymidins durch die Einwirkung von aus den Kulturzellen freigesetzten Enzymen entstehen können (59) oder z.T. auch Abbauprodukte des  $^3\text{H}$ -Thymidins wieder in die Umgebung sezerniert werden (60), erscheint es denkbar, daß auch diese markierten Substanzen wieder in den Stoffwechsel anderer Zellen eingehen und dort nach ihrer Verwertung zu einer cytoplasmatischen Markierung beitragen.

Da der größte Teil dieser  $^3\text{H}$ -Thymidin-Abbauprodukte aber säurelöslich ist und nur in geringem Maße in Zellstrukturen eingebaut wird (18,87) , ist nur mit einer diskreten Markierung durch  $^3\text{H}$ -Thymidinabbauprodukte zu rechnen.

Die über infizierten Makrophagen p.i. auftretende cytoplasmatische Markierung ist ausgeprägt und tritt schon nach relativ kurzen  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen auf.

$^3\text{H}$ -markierte Abbauprodukte des Thymidins als Ursache für diese Markierung kommt hier also nicht in Betracht, zumal in nicht infizierten Makrophagen, in denen mit dem Auftreten ähnlicher Thymidinabbauprodukte gerechnet werden könnte, auch nach längeren  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen keine solche cytoplasmatische Markierung auftritt.

Aus ähnlichen Gründen sind solche Thymidinabbauprodukte auch für die über mit HSV infizierten BHK-Zellen p.i. auftretende ausgeprägte cytoplasmatische Markierung unwahrscheinlich.

Lediglich für die über den nicht-infizierten BHK-Zellen

nach extrem langen  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen auftretende, außerordentlich diskrete cytoplasmatische Markierung sind  $^3\text{H}$ -Thymidinabbauprodukte möglicherweise verantwortlich. Denkbar wäre auch, daß die hier auftretende diskrete cytoplasmatische Markierung durch markierte mitochondriale DNA verursacht wird.

So zeigt Neubert et al (67), daß eine Inkorporation von  $^3\text{H}$ -Thymidin in mitochondriale DNA erfolgt.

### 3. Die cytoplasmatische Markierung p.i. ist durch die Gegenwart sich replizierender Mykoplasmen bedingt

Ursache für eine cytoplasmatische Markierung nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin können auch sich replizierende Mykoplasmen sein.

So zeigen Jones et al (47), daß mit Mykoplasma pulmonis infizierte Makrophagen nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin (1 uCi/ml) über 4 Std. p.i. z.T. eine große Zahl SK über dem gesamten Cytoplasma aufweisen.

Daß die in den vorliegenden Untersuchungen aufgetretene cytoplasmatische Markierung nach Infektion mit HSV durch die Anwesenheit von Mykoplasmen bedingt ist, erscheint aber aus mehreren Gründen unwahrscheinlich:

A. Makrophagen in den nicht infizierten Populationen zeigen keine starke cytoplasmatische Markierung. Da die Makrophagen vor ihrer Aussaat gepoolt wurden und aus diesem Makrophagenpool jeweils die für die Herstellung der Versuchskulturen notwendigen Zellen entnommen wurden, ist eine Mykoplasmenverseuchung der Makrophagenkulturen von Anfang an ausgeschlossen, da ja sonst in allen Kulturen eine solche cytoplasmatische Markierung auftreten müßte.

B. Die cytoplasmatische Markierung tritt in mit HSV infizierten Zellkulturen auf, deshalb wäre eine Passagierung und Übertragung von Mykoplasmen mit der virus-

haltigen Suspension denkbar. Dagegen sprechen die folgenden Überlegungen:

- a. Die Viruszüchtung erfolgte unter Tylosan, einem Stoff der die Mykoplasmenreduplikation hemmt.
- b. Alle Makrophagenpopulationen wurden jeweils mit Material aus der gleichen gepoolten Virussuspension infiziert. Trotzdem beobachtet man in der Hauptsache eine cytoplasmatische Markierung über aktivierten Makrophagen, obwohl gerade aktivierte Makrophagen eine erhöhte Bakterizidie für intrazelluläre Mikroorganismen zugeschrieben wird und die Fähigkeit zur intrazellulären Vernichtung sogar als Markereigenschaft der aktivierten Makrophagen anzusehen ist (61) .
- c. Eine cytoplasmatische Markierung tritt über den Makrophagen erst nach  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen von 10 Std. Dauer auf. Mit einer Mykoplasmen bedingten cytoplasmatischen Markierung wäre aber schon nach kürzeren Inkubationszeiten zu rechnen. Jones et al (47) beobachtet bei Mykoplasma pulmonis eine Generationszeit von 2-4 Std. und findet deshalb schon bei  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen von 4 Std. Dauer eine ausgeprägte cytoplasmatische Markierung über Makrophagen.
- d. Der Anteil der cytoplasmatisch markierten Zellen ist je nach zur Infektion verwandtem Virus in gleichartigen Makrophagenpopulationen unterschiedlich groß, in der mit aus der jeweils gleichen Virussuspension infizierten BHK-Zellkultur fast gleich.  
Bei Vorliegen eines identischen Mykoplasmen-Stammes sowohl in der HSV Typ I-Suspension als auch in der HSV Typ II-Suspension, müßte sich dieser bei gleich guter Vermehrungbarkeit in BHK-Zellen unterschiedlich gut in gleichartigen Makrophagenpopulationen vermehren, wie der Vergleich der p.i. über dem Cytoplasma markierten Zellen zeigt.

Bei Vorliegen unterschiedlicher Mykoplasmen-Stämme in den beiden zur Infektion verwandten Virussuspensionen, müßten sich diese bei in gleichartigen Makrophagen-kulturen gezeigtem unterschiedlichen Vermehrungsverhalten in der BHK-Zellkultur gleich gut vermehren.

- e. Es finden sich keine stark cytoplasmatisch markierten Zellen, die nicht gleichzeitig eine starke Markierung des Kerns aufweisen, wobei die über dem Kern auftretende Markierung auf Grund unterschiedlicher SK-Dichte von der übrigen immer gut abgrenzbar ist. Die cytoplasmatische Markierung folgt der Kernmarkierung in der Zeit .

Aus allem ergibt sich, daß als Ursache für die p.i. nach langen  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen auftretende starke cytoplasmatische Markierung sowohl in mit HSV infizierten Makrophagen als auch in mit HSV infizierten BHK-Zellen im Cytoplasma liegende Virus-DNA anzusehen ist, die im Rahmen des in den infizierten Zellen ablaufenden viralen Vermehrungszyklus in das Cytoplasma ausgeschleust wurde. Eine Verstärkung dieser cytoplasmatische Markierung erfolgt eventuell durch Adsorption und/oder Pinocytose von bereits von anderen Zellen der Kultur freigesetzten neusynthetisierten Virusteilchen mit radioaktiv markierter DNA.

Die in den nicht infizierten BHK-Zellen nach extrem langen  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen auftretende diskrete cytoplasmatische Markierung ist am ehesten durch in Zellstrukturen eingebaute radioaktiv markierte  $^3\text{H}$ -Thymidin-Abbauprodukte und/oder durch markierte mitochondriale DNA bedingt.

III.5.3. DIE DNA- UND RNA-SYNTHESE IN NICHT INFIZIERTEN  
UND MIT HSV INFIZIERTEN NORMALEN UND AKTIVIERTEN  
MAKROPHAGEN

III.5.3.1. DIE DNA- UND RNA-SYNTHESE IN NICHT INFIZIERTEN  
NORMALEN UND AKTIVIERTEN MAKROPHAGEN

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, die Auswirkungen der Infektion mit HSV auf den DNA- und RNA-Stoffwechsel in normalen und aktivierten Makrophagen aus NMRI- und C 57/bl-Mäusen auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Zunächst mußten deshalb Erkenntnisse über den DNA- und RNA-Stoffwechsel in nicht mit HSV infizierten Makrophagen gewonnen werden.

Dabei zeigte sich, daß normale C 57/bl Makrophagen keine autoradiographisch auswertbare DNA-Synthese aufweisen und auch nach der Infektion mit HSV keine verwertbare Markierung nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin erfolgt. Auch Frank et al (38), Schindling (86) und Lopez beobachteten in Makrophagen aus C 57/bl Mäusen keine Vermehrung des HSV.

Ebenso war in den Populationen aus normalen NMRI-Makrophagen der weitaus größte Teil der Zellen in Bezug auf eine ablaufende zelluläre DNA-Synthese autoradiographisch stumm.

Diese keine zelluläre DNA-Synthese zeigenden Zellen befinden sich in einer ' $G_0$ '-Phase, es sei denn, daß ihre  $G_1$  oder  $G_2$ -Phase so lang und/oder ihre DNA-Synthese pro Zeiteinheit in einer ablaufenden S-Phase so gering ist, daß die Bedingungen der durchgeführten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulse zur Messung zu unempfindlich waren und dadurch die Aussage über den Zellzustand eingeschränkt werden müßte. Auch bei Gordon und Cohn (40) werden in vitro vorliegende Peritoneal-Makrophagen als Zellen, die sich in einer  $G_0$ -Phase befinden, beschrieben.

Für diese keine zelluläre DNA-Synthese zeigende Zellfraktion kann sicher nicht angenommen werden, daß hier 'G<sub>0</sub>' für sich 'nicht mehr teilende Zellen, die aber durch gewisse Stimulationen zur Produktion zellulärer DNA mit folgender Zellteilung angeregt werden können' steht- eine zum Teil weit verbreitete Auffassung über die 'G<sub>0</sub>'-Phase (87). Hier trifft eher die von Wolfsberg (100) über die G<sub>0</sub>-Phase geäußerte Auffassung zu, daß 'die in einer G<sub>0</sub>-Phase befindlichen Zellen zu der nicht wachsenden Fraktion' der Zellpopulation gehören, da sich in Populationen aus aktivierten Makrophagen keine entsprechende Fraktion dieser im 'Normalzustand' keine zelluläre DNA-Synthese zeigenden Zellen fand, die durch die Aktivierung zu einer entsprechenden Synthese zellulärer DNA angeregt worden wäre.

Eine kleine Gruppe normaler NMRI-Makrophagen zeigt aber, wenn auch erst nach relativ langen <sup>3</sup>H-Thymidin-Pulsen entsprechender Aktivität/ml, eine Synthese zellulärer DNA.

In Populationen aus jungen Makrophagen ist dieser Anteil zelluläre DNA-Synthese zeigender Zellen-möglicherweise infolge der 'Unreife' der aus vier Wochen alten Mäusen gewonnenen Makrophagen bedingt- größer als in Populationen aus alten Makrophagen. Auch Johnson (46) beobachtet in Populationen aus 'jüngeren' Makrophagen eine größere Zahl Zellen mit zellulärer DNA-Synthese als in Makrophagen aus 'älteren' Mäusen. Andere Autoren beobachten einen ähnlichen Unterschied zwischen 'jüngeren' und 'älteren' Individuen bei der Untersuchung von Rattenleberzellen (41, 42, 78).

Da sich die Zahl der Zellen, die nach <sup>3</sup>H-Thymidin-Inkubation eine Kernmarkierung aufweisen, in den Populationen aus jungen Makrophagen mit zunehmender Pulsdauer vergrößert, durchlaufen hier diese zelluläre DNA-Synthese zeigenden

Zellen möglicherweise komplette Zellzyklen, obwohl direkt keine Mitosen beobachtet werden konnten.

In alten Makrophagen, die aus 12 Wochen alten Mäusen gewonnen wurden, dient die festgestellte Synthese zellulärer DNA sicher nicht der Verdoppelung des genetischen Materials für eine folgende Zellteilung, da keine Mitosen und keine Zunahme der markierten Zellen nach längeren  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen beobachtet wurden. Dagegen spricht auch die beobachtete niedrige Syntheserate zellulärer DNA, die Ausdruck eines 'DNA-Repair' im Sinne von Pelc (70,71) sein könnte.

Bei allem ist zu beachten, daß diese zelluläre DNA-Synthese zeigende Zellfraktion sowohl in Kulturen aus jungen als auch in Kulturen aus alten Makrophagen sehr klein und die beobachtete Syntheserate zellulärer DNA sehr gering ist.

Zellen mit einer hohen DNA-Syntheserate sind in der normalen Makrophagenkultur 'Einzelindividuen'. Sie machen meist weniger als 1 % der gesamten Makrophagenkultur aus. Eventuell sind diese Zellen die Vorläufer der in der Kultur aus aktivierten Makrophagen auftretenden teilungsfähigen Zellen, die eine hohe Syntheserate zellulärer DNA aufweisen.

Die für die Kultur aus normalen Makrophagen beobachteten Ergebnisse stimmen gut mit denen von anderen gefundenen überein.

Van Furth (96) erhält zwischen 0.5 % und 5.9 % markierte Makrophagen nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin.

Dieser Wert korreliert gut mit dem beobachteten Anteil von 4-8 % markierten Makrophagen in der Population aus alten Makrophagen. (Aus der Gewichtsangabe der von van Furth (96) verwendeten Mäuse kann geschlossen werden, daß es sich in seinen Versuchen um Makrophagen aus älteren Tieren handelt.)

Die von Tewari et al (94) nach 1 stündigen  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen beobachteten weniger als 1 % markierten Makro-

phagen finden ein gutes Korrelat in dem sowohl in Kulturen aus jungen als auch in den Kulturen aus alten Makrophagen beobachteten Anteil von weniger als 1 % stark markierter Makrophagen.

Der von Frank et al (38) gemessene geringe Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin in Makrophagenkulturen findet sein Spiegelbild in dem beobachteten kleinen Anteil geringe zelluläre DNA-Synthese zeigender Zellen.

Auch in Populationen aus aktivierten Makrophagen ist der größte Teil der Zellen in bezug auf eine ablaufende zelluläre DNA-Synthese autoradiographisch stumm.

Die Aktivierung bewirkt keine allgemeine Induktion der zellulären DNA-Synthese.

Eine kleine Fraktion aktivierter Makrophagen zeigt eine Synthese zellulärer DNA, wobei ein Teil dieser Fraktion eine hohe DNA-Syntheserate aufweist und der andere eine niedrige.

Diejenigen Zellen mit hoher DNA-Syntheserate sind der proliferative Zellpool in der aktivierten Makrophagenpopulation: sie durchlaufen vollständige Zellzyklen mit Zellteilung und bilden innerhalb der Kulturen Kolonien. Ihr Anteil liegt zwischen 1-5 % mit zunehmender Tendenz bei längeren  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkubationszeiten.

Ein Unterschied hinsichtlich dieser zelluläre DNA-Synthese zeigenden Zellfraktion, die ja in jungen, 'unreiferen' Makrophagenpopulationen größer ist als in den Populationen aus alten, 'reiferen' Makrophagen, besteht bei aktivierten Makrophagen nicht mehr. Die Aktivierung hat in dieser Hinsicht die Populationen aus jungen und alten Makrophagen nivelliert.

Stewart et al (91) beobachten 4 % markierte Zellen in Kulturen, die aus mit Thioglykollat vorbehandelten Mäusen gewonnenen Makrophagen bestehen, bei Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin über 2 Std. unmittelbar nach der Aussaat. Bei Inkubation am 2. Tag zeigen sich 11.5 % markierte Zellen nach 2-Std.-Pulsen (91).

Als Zusatz zum Kulturmedium wird von Stewart et al (91) aber 'L-cell-conditioned-medium', das einen Faktor enthalten soll, der für die Proliferation der Makrophagen notwendig sein soll, hinzugefügt (91) .

Auch Defendi (21) beschreibt als Voraussetzung für die Proliferation von Makrophagen neben ihrer Aktivierung und (einem) in Serum vorhandenen dialysierbare(n) Faktor(en), daß durch andere Zellen beeinflusstes 'conditioned' Medium mit einem 'Macrophage-Growth-Factor ' vorhanden sein muß.

Die Fähigkeit von Makrophagen zur Proliferation soll deshalb vollkommen von anderen Zellen abhängen (21).

In den vorliegenden Untersuchungen wurde den aktivierten Makrophagen kein 'cell-conditioned-medium' gesondert zugesetzt.

Hierin ist möglicherweise die Ursache in dem geringen Anteil zelluläre DNA-Synthese aufweisender Zellen zu sehen, die sich nach dem 3. Tag nach der Aussaat durchgeführten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen zeigten.

Nach 2 stündigen  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen zeigen sich in den getesteten Kulturen aus aktivierten Makrophagen 2-6% Zellen mit Kernmarkierung, während Stewart et al (91) schon am 2. Tag nach der Aussaat 11.5 % und am 4. Tag nach der Aussaat sogar 18 % Zellen mit Markierung nach zweistündigen  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulsen beobachten können. Da sich in den getesteten Makrophagenkulturen aber auch ohne Zusatz des von Defendi (21) postulierten 'macrophage growth factor' bzw. ohne den von Stewart (91) im 'L-cell-conditioned-medium' postulierten Faktor eine zur Proliferation fähige Makrophagenfraktion zeigte, sind diese postulierten Faktoren offensichtlich nicht unbedingt zur Proliferation aktivierter Makrophagen notwendig.

Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß schon in der Maus nach Injektion des Thioglykollats ein durch

andere Zellen der Peritonealhöhle produzierter 'Makrophagenwachstumsfaktor' auf einen dafür empfänglichen Teil der Makrophagen einwirkte und diese Makrophagen dann die in vitro sich teilende und zelluläre DNA bildende Zellgruppe darstellen.

Der Synthese zellulärer DNA in aktivierten Makrophagen in vitro folgt nicht in jedem Fall eine Zellteilung, wie das Auftreten von zweikernigen Zellen mit Markierung über beiden Kernen und das Auftreten von Kernteilungsfiguren ohne Zeichen für eine folgende Zellteilung zeigen.

Auch Defendi (21) und Stewart et al (91) beobachteten in Kulturen aus aktivierten Makrophagen zweikernige Zellen und ziehen ähnliche Schlußfolgerungen.

Die Untersuchungen über den Einbau von  $^3\text{H}$ -Uridin ergaben, daß viele Zellen der Makrophagenkultur eine autoradiographisch meßbare RNA-Synthese zeigen.

Die Zahl der RNA-synthetisierenden Zellen nimmt nach Versuchsbeginn von 63 % auf 85 % in einem Zeitraum von 23 Std. zu.

Ursache für diese Zunahme ist möglicherweise der unmittelbar vor Versuchsbeginn durchgeführte Mediumwechsel, der z.B. durch die zur Verfügungstellung von neuen Substraten in einem Teil der Zellen die RNA-Synthese anregt.

Auch Tewari et al (94) beobachteten bei der szintillatorischen Messung des  $^3\text{H}$ -Uridin-Einbaus in Makrophagenkulturen eine Zunahme der synthetisierten RNA nach Versuchsbeginn.

Die Aktivierung mit Thioglykollat senkt die Zahl der Zellen mit hoher RNA-Syntheserate in der Makrophagenkultur. Daneben wird der Turnover der RNA vermindert, wie der verminderte Anteil gleichzeitig stark über dem Kern und Cytoplasma markierte Zellen zeigt.

Da jedoch autoradiographische Untersuchungen keine Aussage über die Größe des RNA-Pools gestatten,

steht die beobachtete niedrige Einbaurate von  $^3\text{H}$ -Uridin nicht unbedingt im Widerspruch zu der sonst bei aktivierten Makrophagen festzustellenden erhöhten biologischen Aktivität.

Auch Frank et al (38) beobachten bei der szintillatorischen Messung des  $^3\text{H}$ -Uridin-Einbaus in der Kultur aus aktivierten alten NMRI-Makrophagen nur eine im Vergleich zu nicht aktivierten Makrophagen gering erhöhte  $^3\text{H}$ -Uridin-Inkorporation in die säureunlösliche Fraktion.

### III.5.3.2. DIE DNA- UND RNA-SYNTHESE IN MIT HSV-LENNETTE UND HSV-D-316 INFIZIERTEN NORMALEN UND AKTIVierten MAKROPHAGEN

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß in einem großen Teil der Zellen einer 'normalen' Makrophagenkultur nach der Infektion mit HSV herpesspezifische DNA gebildet wird.

Die Synthese viraler DNA p.i. erfolgt auch in solchen Zellen, die vorher keine zelluläre DNA-Synthese zeigen und pro Zelle gesehen wird relativ viel virale DNA synthetisiert.

Auch Stevens et al (90) beobachten nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymin 6 Std. p.i. in mit HSV infizierten Makrophagenkulturen 50 % markierte Zellen gegenüber 1 % markierte Makrophagen in der nicht infizierten Makrophagenkultur.

Ebenso ist die von Frank et al (38) szintillatorisch gemessene Erhöhung des  $^3\text{H}$ -Thymin-Einbaus in mit HSV infizierten Makrophagenkulturen mit der beobachteten Steigerung der Zahl DNA synthetisierender Zellen in infizierten Makrophagenkulturen gut in Einklang zu bringen.

Weiter zeigt sich, daß nicht alle Makrophagen einer

Kultur für eine Infektion mit HSV - in dem Sinn, daß in ihnen eine virale DNA-Synthese ablaufen kann-empänglich sind. In einem Teil der Zellen kann sich die virale DNA nicht vermehren.

Da auch in bezug auf andere biochemische Parameter das Vorliegen funktionell heterogener Fraktionen in einer Makrophagenpopulation angenommen wird (37,73,98), wäre deshalb denkbar, daß auch die Möglichkeit der Vermehrung viraler DNA auf eine bestimmte Zellfraktion innerhalb der Makrophagenpopulation beschränkt ist.

Auch innerhalb der Makrophagenfraktion, in der die Reduplikation viraler DNA möglich ist, ist die Empfänglichkeit für eine Infektion bzw. die Möglichkeit der Reduplikation herpespezifischer DNA unterschiedlich und scheint vom funktionellen Zustand der einzelnen Zellen abzuhängen: trotz Verimpfung von 10 pfu pro Makrophage ist der Synthesebeginn viraler DNA bei gleicher Infektionszeit p.i. zeitlich verschoben. Ein Teil der Zellen zeigt p.i. früher virale DNA-Synthese als der übrige.

Die Aktivierung mit Thioglykollat ebnet den Weg für die Synthese viraler DNA in den Makrophagen: in der Population aus aktivierten Makrophagen erfolgt nach der Infektion mit HSV in mehr Zellen die Synthese viraler DNA p.i. als in Kulturen aus normalen Makrophagen. Auch hier ist die Synthese viraler DNA nicht von der Fähigkeit der Zellen zur Produktion zellulärer DNA abhängig.

Die Makrophagenpopulation ist durch die Aktivierung in bezug auf die Reduplikationsmöglichkeit herpespezifischer DNA in den einzelnen Zellen 'homogener' geworden. Da auch auf die einzelne Zellen bezogen mehr virale DNA synthetisiert wird, erscheinen die Zellen gegenüber der HSV-Infektion weniger 'resistent' als normale Makrophagen.

In mit HSV infizierten Kulturen aus aktivierten Makrophagen beobachten auch Frank et al (38) eine weitaus höhere  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation in säureunlösliches Material als in Kulturen aus infizierten normalen Makrophagen (38).

Schindling (86) stellt in Populationen aus aktivierten Makrophagen eine im Vergleich mit normalen Makrophagen gesteigerte Vermehrung von HSV fest. Eine gesteigerte Vermehrung anderer Viren in mit Thioglykollat aktivierten Makrophagen findet auch Eustatia et al (28) .

Welche Mechanismen in der Population aus aktivierten Makrophagen letztendlich für die in mehr Zellen dieser Population festzustellende Synthese virusspezifischer DNA verantwortlich sind bleibt offen.

Zum einen wäre denkbar, daß die durch die Aktivierung bedingte Erhöhung des allgemeinen zellulären Stoffwechsels die Makrophagen innerhalb der Population so 'synchronisiert' werden, daß -im Zusammenhang mit einem Mehrangebot an Substraten und Enzymen- bessere Voraussetzungen für die Synthese bzw. Reduplikation viraler DNA gegeben sind.

Möglicherweise spielt auch die erhaltene Potenz aktivierter Makrophagen auch nach der Infektion mit HSV noch RNA zu synthetisieren in diesem Zusammenhang eine Rolle. oder ist zumindest ein Indikator für Mechanismen, die eine bessere Vermehrung von HSV-DNA in aktivierten Makrophagen ermöglichen.

In Verbindung mit den Ergebnissen von Zismann et al (102), der eine 100 mal größere Adsorptionsrate von HSV bei Proteose-Pepton aktivierten Makrophagen im Vergleich zu normalen Makrophagen feststellt und der von anderen (92) gegenüber normalen Makrophagen beobachteten gesteigerten Phagozytoseaktivität von aktivierten Makrophagen kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß die in mehr Zellen einer Population aus aktivierten Makrophagen ablaufende Synthese viraler DNA auf einer besseren

'Infizierbarkeit' der aktivierten Makrophagen beruht, z.B. infolge einer besseren Aufnahme von pfu. Gegen diese Annahme spricht aber die hohe Infektionsdosis von 10 pfu pro Makrophage, die zur Infektion der Makrophagenkulturen verwendet wurde. Bei einer solchen Infektionsdosis sollte man eigentlich nicht damit rechnen müssen, daß eine gesteigerte Pinocytose-rate als alleinige Ursache für die festgestellte bessere Vermehrbarkeit herpespezifischer DNA in den aktivierten Makrophagen anzusehen ist.

Auch das, wie unten näher beschrieben, unterschiedliche Vermehrungsverhalten von HSV-Lennette- und HSV-D-316-DNA in den Makrophagenkulturen spricht eher für einen im zellulären Stoffwechsel liegenden Mechanismus, der die Vermehrung der entsprechenden Virus-DNA fördert oder nicht fördert.

Ein weiteres Ergebnis der durchgeführten Untersuchungen ist, daß sich Lennette-spezifische DNA besser und in mehr Zellen einer Makrophagenkultur vermehren kann als D-316-spezifische. Die NMRI-Makrophagen scheinen gegen HSV-D-316 'resistenter' zu sein.

Die bessere Reduplikationsmöglichkeit von Lennette-spezifischer DNA geht mit einem gegenüber mit HSV-D-316 infizierten Makrophagenkulturen ausgeprägterem Zellverlust durch cytopathischen Effekt im Beobachtungszeitraum einher. Da die Infektion der Makrophagenpopulationen sowohl bei der Infektion mit HSV-Lennette als auch bei der Infektion mit HSV-D-316 mit etwa gleicher pfu-Menge erfolgte, aber in der mit HSV-Lennette infizierten Makrophagenkultur trotzdem immer in mehr Zellen die Synthese viraler DNA ablief als in den entsprechenden mit HSV-D-316 infizierten Makrophagenkulturen, müssen jeweils in den Zellen herrschende spezifische Bedingungen in dem einen Fall zu einer besseren, in dem anderen Fall zu einer verminderten Reduplikationsmöglichkeit viraler DNA geführt haben.

Inwieweit dabei die in mit HSV-D-316 infizierten Makrophagen häufiger zu beobachtenden, von den übrigen Zellkompartimenten getrennten 'Vakuolen' mit viraler DNA-Synthese eine Rolle spielen bleibt offen (s.a. Abb. Nr. 9).

Dafür, daß biochemische Mechanismen innerhalb der Zellen und nicht die unterschiedliche Fähigkeit zur Adsorption für die größere 'Resistenz' der Makrophagen gegenüber HSV-D-316 verantwortlich sind, sprechen auch die Untersuchungen von Mogensen (63), der keine Differenz in der Adsorptionsfähigkeit von HSV vom Typ I oder Typ II bei Peritonealmakrophagen feststellen kann.

In Verbindung mit weiteren Ergebnissen von Mogensen (63), daß nämlich in Balb/c-Makrophagen eine schlechtere Vermehrung des HSV-Mac-Intyre (HSV Typ I) gegenüber dem HSV-MS (HSV Typ II) festzustellen ist, ein Ergebnis, daß auf die Typenspezifität dem in den vorliegenden Untersuchungen Gefundenem gerade entgegengesetzt ist, liegt die Vermutung nahe, daß die Vermehrungsfähigkeit des HSV in Makrophagen keine typenspezifische sondern eine stammspezifische Eigenschaft des HSV ist.

Unter dieser Annahme wäre auch die beobachtete geringere Cytotoxizität von HSV-D-316 (HSV Typ II) gegenüber der von HSV-Lennette (HSV Typ I) kein Widerspruch zu den Befunden von Mogensen (63), der gerade für den Stamm Mac Intyre (HSV Typ I) eine verringerte Cytotoxizität gegenüber dem Stamm MS (HSV Typ II) feststellt.

Voraussetzung für diesen Vergleich ist, daß die in den vorliegenden Untersuchungen gemessene virale DNA-Synthese auch von einer entsprechenden Produktion infektiöser Teilchen gefolgt wird.

Ist das nicht der Fall, so sind die beobachteten Werte mit denen von Mogensen (63) nicht zu vergleichen, da dieser seine Ergebnisse mit Hilfe von 'infectious center assays' gewinnt, die die Zahl der produzierten infektiösen Teilchen anzeigen, aber kein Maß für die überhaupt in Makro-

phagen synthetisierte virale DNA p.i. darstellen.

Auch in Populationen aus aktivierten Makrophagen kann sich Lennette-spezifische DNA besser und in mehr Zellen einer Makrophagenkultur vermehren als D-316-spezifische DNA.

Die Aktivierung ändert den funktionellen Zustand der Makrophagen also nicht derart, daß die eine HSV-D-316-DNA-Synthese einschränkenden Mechanismen vollkommen aufgehoben werden.

Diese Befunde stehen in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Frank et al (38), die auch in aktivierten Makrophagenkulturen eine höhere  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation nach Infektion mit HSV-Lennette im Vergleich zu mit HSV-D-316 infizierten Makrophagenkulturen beobachten; ebenso mit denen von Schindling (86), die auch in aktivierten Makrophagenpopulationen eine gesteigerte Vermehrungstendenz von HSV-Lennette gegenüber HSV-D-316 feststellt.

Ob die beobachteten Synthesemöglichkeiten herpesspezifischer DNA für das Zellsystem 'Makrophagenkultur' spezifisch sind, läßt sich nicht entscheiden.

Mogensen (63) beschreibt z.B. für Peritoneal-Lymphozyten keine Vermehrung von HSV, für Fibroblasten aber ebenso wie Schindling (86) eine bessere Vermehrung von HSV Typ I gegenüber HSV Typ II.

Auch in KAN-Zellen und Mäuseembryonalzellen stellt man eine besser Vermehrung von HSV Typ I im Vergleich mit HSV vom Typ II fest (63,65,76,75).

Andererseits zeigten die zur Kontrolle infizierten BHK-Zellen dieses ausgeprägte unterschiedliche Vermehrungsverhalten von Lennete-spezifischer (Typ I) und D-316-spezifischer (HSV Typ II) DNA nicht.

Betrachtet man die Vermehrungsfähigkeit herpesspezifischer DNA in Kulturen aus normalen jungen, aus 4 Wochen alten Mäusen gewonnenen Makrophagen und in Kulturen aus normalen alten, aus 12 Wochen alten Mäusen gewonnenen Makrophagen, so stellt man fest, daß sich p.i. in mehr Zellen einer Kultur aus alten Makrophagen HSV-DNA vermehrt als in der Kultur aus jungen Makrophagen. Auch die pro Zelle p.i. synthetisierte Menge viraler DNA ist i.d.R. in alten Makrophagen größer als in jungen.

Das Zellreservoir, in dem sich herpesspezifische DNA vermehren kann ist in Populationen aus alten Makrophagen größer als in Populationen aus jungen 'unreiferen' Makrophagen.

Inwieweit dieser in vitro beobachtete Unterschied mit der von anderen (44,46,102) in vivo festgestellten höheren Empfänglichkeit der Säuglingsmaus für eine Infektion mit HSV im Vergleich zu älteren Mäusen in Übereinstimmung zu bringen ist bleibt offen.

Z.B. beobachtet Johnson (46) eine sich mit zunehmendem Alter entwickelnde Resistenz gegenüber der Infektion mit HSV bei Mäusen. Zisman et al (102) erhöhen die Resistenz von Säuglingsmäusen gegenüber der Infektion mit HSV gerade durch die Übertragung von Makrophagen aus älteren Mäusen. Eine Übereinstimmung mit diesen Befunden wäre dann anzunehmen, wenn die in den vorliegenden Versuchen gemessene Produktion viraler DNA nicht unbedingt die Produktion infektionstüchtiger, kompletter Viruspartikel widerspiegelt, sondern lediglich anzeigt, daß die Infektion mit HSV in Makrophagen die Synthese virusspezifischer DNA induziert, aber ein entsprechender Einbau der synthetisierten DNA in infektionstüchtige pfu nicht erfolgt und gerade die in alten Makrophagen festzustellende hohe Reduplikationsrate viraler DNA nicht mit einer entsprechenden Produktion zur Infektion fähiger Teilchen einhergeht.

Zieht man die Befunde von Stevens und Cook (90) hinzu, die zeigen, daß mit HSV infizierte Makrophagen nur wenige

komplette Viruspartikel produzieren, obwohl in einem großen Teil der Zellen die Synthese herpesspezifischer DNA induziert wird und die im Zusammenhang mit anderen Parametern folgern, daß zum einen strukturedefekte HSV-DNA produziert und zum anderen möglicherweise die Montage der einzelnen Bausteine zum kompletten Virus gestört ist, erscheinen diese Überlegungen in gewissem Grade gültig.

Andererseits lassen aber die Befunde von Schindling (86), die über einen direkten Nachweis von pfu zeigt, daß sich HSV-Lennette in Makrophagen besser vermehrt als HSV-D-316 und daß in aktivierten Makrophagen eine bessere Vermehrung beider HSV-Stämme zu registrieren ist, eine direkte Korrelation zwischen überhaupt produzierter HSV-DNA und daraus resultierenden infektiösen Partikeln vermuten, wie ein Vergleich mit den in den vorliegenden Untersuchungen beschriebenen Ergebnissen zeigt.

Daneben ist auch zu beachten, daß die in den vorliegenden Untersuchungen getesteten Makrophagen keine 'Säuglingsmakrophagen' im eigentlichen Sinne sind, da die Makrophagen, wie bei Stevens und Cook (90), aus 4 Wochen alten Mäusen gewonnen wurden.

Insgesamt zeigen die durchgeführten autoradiographischen Untersuchungen, daß zur sicheren Beurteilung des  $^3\text{H}$ -Thymidineinbaus mit Hilfe der Autoradiographie sowohl bei der Untersuchung von nicht infizierten als auch bei der Untersuchung von mit HSV infizierten Makrophagen  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulse ausreichender Dauer und mit ausreichender Aktivität eingesetzt werden müssen. Die Autoradiographie ermöglicht dann eine Verfolgung der Synthese sowohl von zellulärer als auch von viraler DNA, wobei durch die Methode bedingt auf die einzelne Zelle bezogene Beobachtungen gemacht werden können. Eine sichere Aussage über die Produktion kompletter Viruspartikel bleibt aber anderen Untersuchungsmethoden vorbehalten.

Daneben müssen wegen der unterschiedlichen Resistenzlage der einzelnen Mäusestämme die Herkunft der Makrophagen, wegen Reifungseinflüssen das Alter der Makrophagen, wegen Auswirkungen des funktionellen Zustandes Beeinflussungen der Makrophagen durch bestimmte Substanzen, wie z.B. Thioglykollat und wegen der unterschiedlichen Vermehrungstendenz der DNA der verschiedenen HSV-Stämme die Eigenschaften des zur Infektion verwandten HSV berücksichtigt werden, um zu einer angemessenen Beurteilung zu gelangen.

IV. AUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINBAU  
VON UDP-<sup>3</sup>H-GALAKTOSE IN BHK- UND KANINCHENNIEREN-  
ZELLEN ALS NACHWEIS VON OBERFLÄCHENGEBUNDENEN  
GLYKOSYLTRANSFERASEN

IV.1. WAS SIND GLYKOSYLTRANSFERASEN ?

In vielen Arbeiten (68,69,84,85,88) wird die Anwesenheit auf der Außenseite der Zellmembran sitzender Enzyme beschrieben, die die Übertragung des Zuckerteils eines phosphorylierten Zuckers auf bestimmte Akzeptoren bewerkstelligen sollen.

Unter Akzeptoren versteht man dabei imkomplett glycosilierte, oligosaccharidhaltige Substanzen, wie z.B. bestimmte Glykoproteine oder Glykolipide (69,88,84).

Die 'Glykosyltransferasen' sind für einen Zucker spezifisch (84,88) .

Z.B. nennt man eine Transferase, die den Zuckerteil von UDP-Galaktose auf einen entsprechenden Acceptor transferiert 'Galaktosyltransferase' (88) :

UDP-Galaktose + Acceptor

Galaktosyltransferase →

Mn<sup>++</sup>

UDP + Galaktose-Acceptor

Mangan wird dabei als Cofaktor dieser Enzyme betrachtet (88).

Funktionell sieht man in den Glykosyltransferasen wichtige Akteure bei verschiedenen Zellinteraktionen, die über an der Oberfläche der Zellmembran gebundene Proteine und Zuckergruppen ablaufen (88).

Sie sollen z.B. bei der Erkennung der Zellen untereinander (88), bei der Zellwanderung (88) und anderen kontakt-

vermittelten Zellinteraktionen, wie Befruchtung (88) oder dem invasiven Wachstum von malignem Gewebe (88) eine entscheidende Rolle spielen.

Da phosphorylierte Zucker im Gegensatz zu freien Zuckern in Analogie zu phosphorylierten Nucleosiden die Zellmembran nicht durchdringen können, sieht man den Nachweis von membranoberflächengebundenen Glykosyltransferasen im Einbau markierter Zuckerteile in entsprechende Acceptoren bei Inkubation von Zellen mit radioaktiv markierten phosphorylierten Zuckern (22,84,85,88). Die inkorporierte Radioaktivität ist dann das Maß für die vorhandene Enzymaktivität.

Andere Autoren (22,51) stehen den bisherigen Untersuchungen und den daraus abgeleiteten Folgerungen in Bezug auf die biologische Wertigkeit der Glykosyltransferasen mit Skepsis gegenüber, weil sie die Existenz solcher Enzyme, die an der Oberfläche der Zellmembran sitzen sollen, für nicht ausreichend bewiesen ansehen. Sie bemängeln vor allem, daß in den bisherigen Untersuchungen eine mögliche intrazelluläre Verarbeitung von zunächst außerhalb der Zelle befindlichen phosphorylierten Zuckern nicht ausreichend ausgeschlossen ist. So zeigen Deppert et al (22), daß BHK-Zellen im Kulturmedium befindliche UDP-Galaktose in zwei Schritten erst zu Galaktose-1-Phosphat und dann zu Galaktose hydrolisieren. Galaktose kann dann durch die Zelle aufgenommen werden, wird metabolisiert und kann -falls radioaktiv strahlend- zu einer Markierung galaktosehaltiger Strukturen, z.B. von in der Zellmembran befindlichen Glykoproteinen führen (22).  $Mn^{++}$  ist dabei als Aktivator der Hydrolyse anzusehen.

Sieht man allein das Resultat, nämlich die durch die transferierte radioaktive Galaktose markierten Substanzen, so kann dies die Umsetzung durch 'oberflächengebundene Glykosyltransferasen' vortäuschen.

Patt et al (68) beobachten ebenfalls diesen Ver-

arbeitungsweg für exogene UDP- $^3\text{H}$ -Galaktose in Mäusemilzzellen. Andererseits stellen Patt et al (68) bei Anwendung gewisser Kriterien, die den intrazellulären Verarbeitungsweg ausschließen sollen, eine Verwertung von exogener UDP- $^3\text{H}$ -Galaktose durch Balb/c 3T3- und SV 40 transformierte 3T3-Zellen fest und schließen, daß diese Zellen eine Galaktosyltransferase an der Oberfläche der Zellmembran besitzen, die den Zuckerteil der UDP-Galaktose auf einen zellulären Acceptor transferieren. Evens (27) beobachtet eine auf der Plasmamembran von Hepatozyten sitzende Nukleotid-Pyrophosphatase, die außerhalb der Zellen befindliche phosphorylierte Zucker abbauen kann.

#### IV.2. AUFGABE UND ZIEL

In den durchzuführenden Untersuchungen sollte der Verbrauch von exogener (außerhalb der Zellen befindlicher) UDP- $^3\text{H}$ -Galaktose durch BHK- und Kaninchennierenzellen (KAN) als Indikator für eine auf der Zelloberfläche vorhandene Galaktosyltransferasenaktivität mit Hilfe der Stripping-Autoradiographie geprüft werden. In Anlehnung an Deppert (22) und Patt (68) sollte dabei eine intrazelluläre Verarbeitung von durch Hydrolyse entstandener  $^3\text{H}$ -Galaktose durch die Gabe von nicht markierter 'kalter' Galaktose im Überschuß verhindert werden. Deppert (22) zeigt z.B., daß sowohl die Inkorporation von  $^3\text{H}$ -Galaktose als auch eine Markierung nach Inkubation mit UDP- $^3\text{H}$ -Galaktose in BHK-Zellen durch die Gabe von kalter Galaktose in einer Konzentration ab 0,3 mMol/l zum Inkubationsmedium deutlich abnimmt, was auf eine Verdrängung der  $^3\text{H}$ -Galaktose im intrazellulären Stoffwechsel durch den Überschuß an kalter Galaktose zu erklären ist. Zunächst mußte deshalb festgestellt werden, ob eine Verminderung der Verwertung exogener  $^3\text{H}$ -Galaktose durch Inku-

bation in einem Medium mit einem Überschuß an kalter Galaktose erfolgt und ob diese Verminderung autoradiographisch meßbar ist. Wenn dies der Fall wäre könnte man durch Inkubation in Medium, welches einen Überschuß an kalter Galaktose enthält, die intrazelluläre Verarbeitung von durch Hydrolyse aus UDP- $^3\text{H}$ -Galaktose entstandener  $^3\text{H}$ -Galaktose weitgehend ausschließen und dies auch autoradiographisch messen.

Eine dann nach Inkubation mit UDP- $^3\text{H}$ -Galaktose in gleichzeitig kalte Galaktose im Überschuß enthaltendem Medium erfolgende Zellmarkierung, wäre ein Hinweis auf eine auf der Zellmembranoberfläche vorhandene Galaktosyltransferasenaktivität, die die Galaktose von der UDP-Galaktose auf einen entsprechenden Acceptor der Zelle überträgt.

#### IV.3. ERGEBNISSE

##### IV.3.1. MARKIERUNG DURCH $^3\text{H}$ -GALAKTOSE IN INKUBATIONSMEDIEN MIT UND OHNE ÜBERSCHUß AN KALTER GALAKTOSE

Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Galaktose Sowohl über BHK-Zellen als auch über KAN-Zellen zeigt sich nach 3 stündiger Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Galaktose eine deutliche Markierung von bis zu 100 SK pro Zelle (s.a. Abb. Nr. 18 u. 19). Zellen, die in BME-Medium ohne Glucose mit  $^3\text{H}$ -Galaktose inkubiert wurden, zeigen eine größere Verwertung der angebotenen  $^3\text{H}$ -Galaktose, was sich in einer i.d.R. größeren SK-Zahl pro Zelle zeigt.

Innerhalb der Zellkultur sind nicht alle Zellen nach  $^3\text{H}$ -Galaktose-Inkubation gleichmäßig markiert, was auf eine vom Zellzyklus abhängige Verwertung der  $^3\text{H}$ -Galaktose hinweist.

Auch in mit HSV-Lennette infizierten BHK- und KAN-Zellkulturen beobachtet man nach  $^3\text{H}$ -Galaktose-Pulsen von 3 Std. Dauer Zellen mit deutlicher Markierung, wobei auch hier -offenbar in Abhängigkeit vom funktionellen

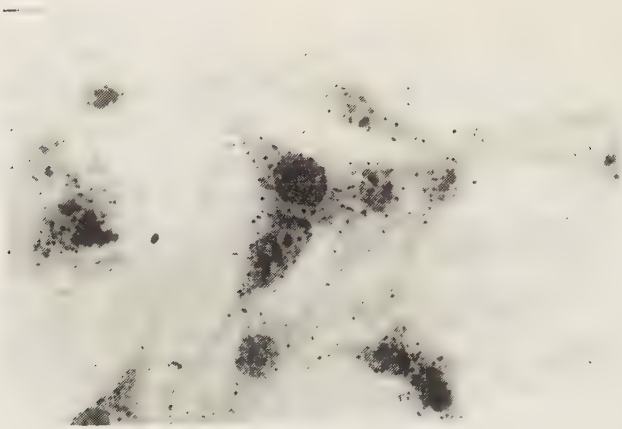


Abb.Nr.18 Mit 1 uCi/ml  $^3\text{H}$ -Galaktose 3 Std. in BME mit Glucose inkubierte BHK-Zellen,Expositionszeit 5 Wochen;deutlich erkennt man eine SK-Belegung aller Zellen

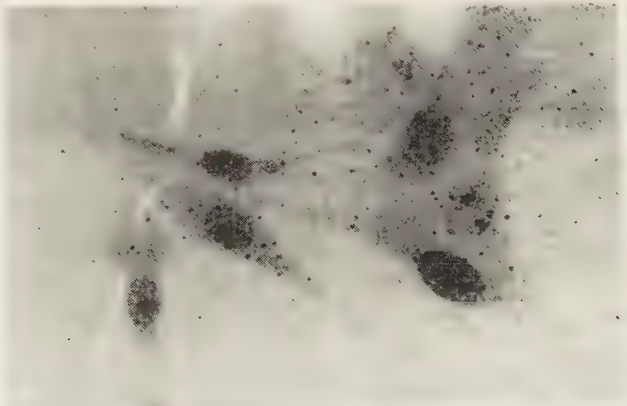


Abb.Nr.19 Mit 1 uCi/ml  $^3\text{H}$ -Galaktose 3 Std. in BME mit Glucose und überschuß an 'kalter' Galaktose inkubierte BHK-Zellen,Expositionsdauer 5 Wochen;die SK-Dichte hat jetzt über den Zellen deutlich abgenommen,z.T. ist der durch die lange Expositionszeit bedingte Background mitverantwortlich für jetzt noch auftretende Zellmarkierung

Zustand der Zellen- die SK-Zahl pro Zelle über den einzelnen Zellen einer Kultur deutlich differiert.

Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Galaktose bei gleichzeitigem Überschuß an kalter Galaktose Werden BHK- oder KAN-Zellen in BME mit 1mMol kalter Galaktose pro Liter inkubiert, so ist die nach 3 stündigen  $^3\text{H}$ -Galaktose-Pulsen auftretende Markierung im Vergleich zu der über in BME-Medium ohne kalte Galaktose inkubierten Zellen auftretenden Markierung wesentlich vermindert. Die SK-Zahl/Zelle beträgt jetzt i.d.R. 0-10 SK (s.a. Abb.Nr. 19).

Das heißt durch den Überschuß an kalter Galaktose ist die heiße, radioaktiv markierte  $^3\text{H}$ -Galaktose so 'verdünnt' worden, daß ihre intrazelluläre Verwertung wesentlich vermindert wird und nur noch eine schwache oder keine Zellmarkierung resultiert.

Diese weitgehende Verdrängung der  $^3\text{H}$ -Galaktose durch kalte Galaktose ist autoradiographisch meßbar.

Auch in mit HSV-Lennette infizierten BHK- und KAN-Zellen wird die nach 3 stündigen  $^3\text{H}$ -Galaktose-Pulsen auftretende Zellmarkierung durch die gleichzeitige Gabe von 1 mMol kalter Galaktose pro Liter Medium wesentlich vermindert.

#### IV.3.2. MARKIERUNG DURCH UDP- $^3\text{H}$ -GALAKTOSE IN INKUBATIONS-MEDIEN MIT UND OHNE ÜBERSCHUß AN KALTER GALAKTOSE

Inkubation mit UDP- $^3\text{H}$ -Galaktose (UDP- $^3\text{H}$ -Gal) In BHK-Zellkulturen beobachtet man nach 3 stündigen UDP- $^3\text{H}$ -Gal-Pulsen von 1 uCi/ml bzw. 2 uCi/ml keine generelle Zellmarkierung, auch nicht von konfluierenden Zellen (s.a.Tab.Nr.5) .

Dagegen beobachtet man einzelne morphologisch unauffällige Zellen, die bis zu 10 SK/Zelle zeigen (= Zelltyp A). Diese Zellen sind in der BHK-Zellkultur äußerst selten und kommen etwa in einer Häufigkeit von  $1 : z \times 10^4$  (mit  $z=1-9$ ) im Verhältnis zu normalen unmarkierten BHK-Zellen vor (s.a. Abb.Nr. 20) .

Tabelle Nr. 5 Art und Häufigkeit markierter Zellen nach Inkubation  
mit UDP-<sup>3</sup>H-Galaktose in BME-Medium mit und ohne Über-  
schuß an kalter Galaktose

| Zellart           | markierte Zellen |      | markierte Zellen |     | markierte konflu- |     |
|-------------------|------------------|------|------------------|-----|-------------------|-----|
|                   | vom Typ A        |      | vom Typ B        |     | ierende Zellen    |     |
|                   | BME-Medium       |      | BME-Medium       |     | BME-Medium        |     |
|                   | ohne             | mit  | ohne             | mit | ohne              | mit |
|                   | kalter Gal       |      | kalter Gal       |     | kalter Gal        |     |
| BHK               | +                | +    | ++               | ++  | -                 | -   |
| BHK o.G.          | +                | +    | +++              | +++ | -                 | -   |
| 3T3               | +++              | +++  | +                | +   | ++++              | -   |
| 3T3 o.G.          | +++              | +++  | ++               | ++  | ++++              | -   |
| BHK m.HSV         | ++++             | ++++ | ++               | ++  | -                 | -   |
| BHK m.HSV<br>o.G. | ++++             | ++++ | +++              | +++ | -                 | -   |
| 3T3 m.HSV         | +++              | +++  | ++               | ++  | -                 | -   |
| 3T3 m.HSV<br>o.G. | +++              | +++  | ++               | +++ | -                 | -   |

o.G.: in BME ohne Glucose inkubiert

m.HSV: mit HSV-Tennette infizierte Kulturen

$+ = 1 : z \times 10^4$  (mit  $z = 1 - 9$  und  $z \times 10^y =$  Zahl der nicht markierten  
 Zellen in der Kultur )

$++ = 1 : z \times 10^3$

$+++ = 1 : z \times 10^2$

$++++ = 1 : z \times 10^1$

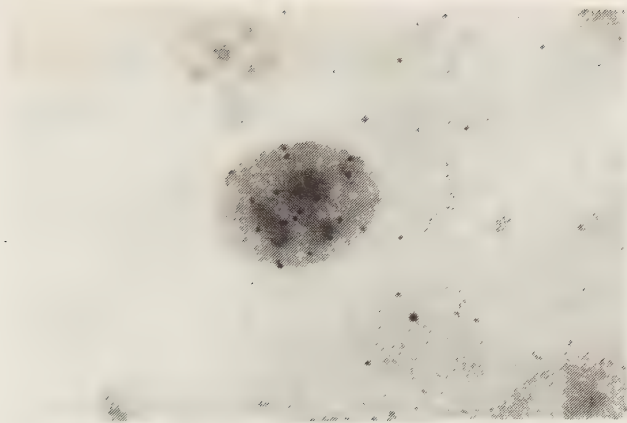


Abb.Nr.20 TYP A ZELLE:hier: BHK-Zelle nach Inkubation mit 2 uCi/ml UDP-<sup>3</sup>H-Galaktose in BME-Medium mit Glucose und Überschuß an 'kalter' Galaktose,Expositionszeit 2 Wochen

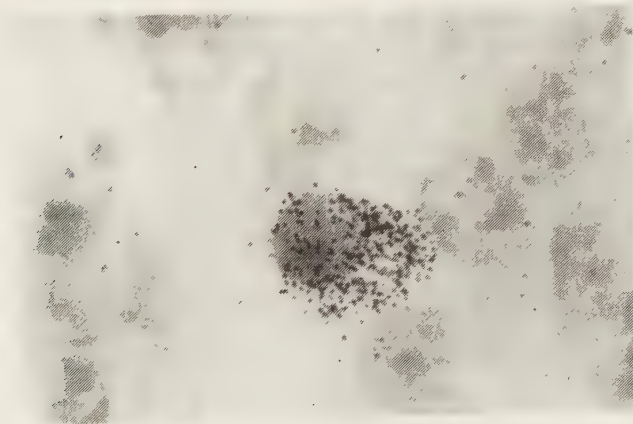


Abb.Nr.21 TYP B ZELLE:hier: BHK-Zelle nach Inkubation mit 1 uCi/ml UDP-<sup>3</sup>H-Galaktose in BME-Medium mit Glucose und Überschuß an 'kalter' Galaktose,Expositionszeit 5 Wochen

Weiter finden sich in der mit UDP-<sup>3</sup>H-Gal inkubierten BHK-Kultur einzelne morphologisch veränderte Zellen, die mit bis zu 50 SK/Zelle markiert sind (Zelltyp B, s.a. Abb. Nr. 21). Diese Zellen sind etwas häufiger in der Kultur zu finden als die markierten Zellen vom Typ A.

Die morphologische Veränderung der Typ B Zellen besteht in der Hauptsache in einem chromatindichten, geschrumpften Kern und kugeligem Zellform. In der Färbung mit Htx zeigt sich diese Veränderung in einer veränderten Anfärbbarkeit gegenüber morphologisch unauffälligen Zellen: Kern und Cytoplasma sind intensiver rot gefärbt. Insgesamt ergibt sich für den Zelltyp B der Eindruck einer sterbenden Zelle. Fast alle in der Kultur vorkommenden Zellen des Typs B zeigen auch eine Markierung nach Inkubation mit UDP-<sup>3</sup>H-Gal .

Werden die BHK-Zellen in BME-Medium ohne Glucose mit UDP-<sup>3</sup>H-Gal inkubiert, so ergibt sich grundsätzlich das gleiche Bild: man findet keine generelle Zellmarkierung, aber auch hier dem Zelltyp A (s.a. Abb. Nr. 20) entsprechende Zellen mit bis zu 10 SK/Zelle und dem Zelltyp B entsprechende morphologisch veränderte Zellen mit bis zu 50 SK/Zelle (s.a. Abb. Nr. 21).

Auffallend ist dabei das häufigere Vorkommen (s.d. Tab. Nr. 5) des Zelltyps B bei Inkubation in BME-Medium ohne Glucose. Offenbar verursacht ein Glucosemangel ein häufigeres Auftreten dieser morphologisch veränderten Zellen.

In der Kultur aus KAN-Zellen bietet sich nach der Inkubation mit UDP-<sup>3</sup>H-Gal ein etwas anderes Bild (s.a. Tab. Nr. 5) . Wie die Abb. Nr. 22 zeigt, finden sich nach UDP-<sup>3</sup>H-Gal-Pulsen markierte konfluierende Zellen, was auf eine generelle Hydrolyse der UDP-<sup>3</sup>H-Gal mit anschließender Verwertung der dabei entstandenen <sup>3</sup>H-Galaktose oder auf ein allgemeines Vorkommen einer Galaktosyltransferasenaktivität hinweisen könnte.

Daneben beobachtet man relativ viele einzelne markierte

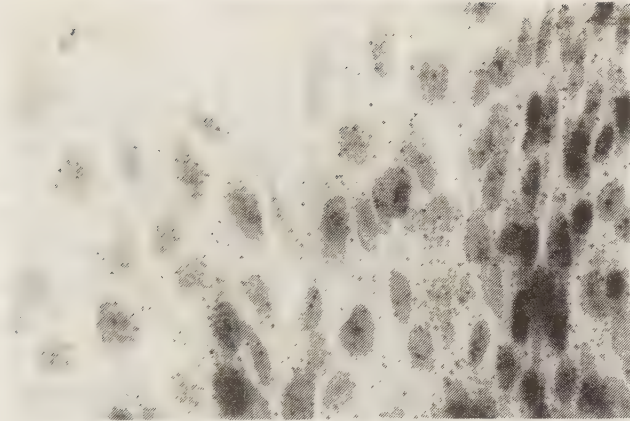


Abb.Nr.22 KAN-Zellen nach Inkubation mit 1 uCi/ml UDP-<sup>3</sup>H-Galaktose in BME-Medium mit Glucose, Expositionszeit 2 Wochen; über den konfluierenden Zellen erkennt man eine deutliche Markierung; diese ist über einzeln liegenden Zellen oder weniger dicht liegenden Zellen fast nicht zu erkennen (Pfeil)

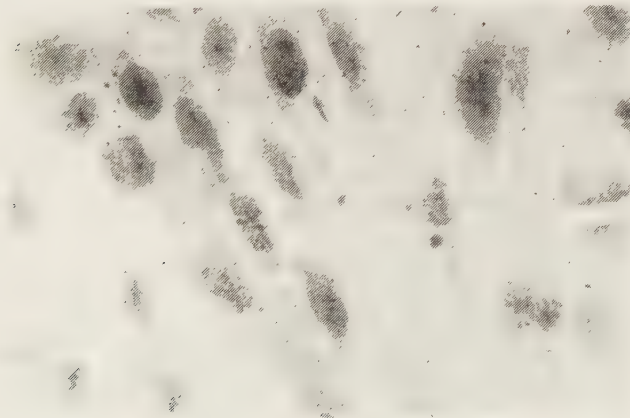


Abb.Nr.23 KAN-Zellen nach Inkubation mit 2 uCi/ml UDP-<sup>3</sup>H-Galaktose in BME-Medium mit Glucose und Überschuß an 'kalter' Galaktose, Expositionszeit 2 Wochen; über konfluierenden Zellen fehlt jetzt eine durchgehende Markierung, wie in Abb.Nr.22, man beobachtet aber SK über einzeln liegenden Zellen

Zellen, etwa im Verhältnis  $1 : z \times 10^2$  (mit  $z=1-9$ ), welche dem in BHK-Kulturen vorkommenden Zelltyp A entsprechen und auch hier um 10 SK/Zelle aufweisen (s.a. Abb.Nr. 20 u. 23) .

Weitertreten auch in der KAN-Zellkultur nach Inkubation mit UDP- $^3\text{H}$ -Gal markierte morphologisch veränderte Zellen mit bis zu 50 SK/Zelle auf, die dem in BHK-Zellkulturen auftretendem Zelltyp B entsprechen (s.a. Abb.Nr. 21) .

In den mit HSV-Lennette infizierten Kulturen aus BHK- und KAN-Zellen finden sich -wie in den nicht infizierten Zellkulturen- nach Inkubation mit UDP- $^3\text{H}$ -Gal markierte Zellen des Typs A und B (s.a. Tab.Nr. 5) .

Auffallend ist aber, daß markierte Zellen des Typs A wesentlich häufiger vorkommen als in nicht infizierten Kulturen. und daß hier die SK-Zahl über den mit HSV infizierten Zellen vom Typ A weit über 10 SK beträgt.

Inkubation mit UDP- $^3\text{H}$ -Gal bei gleichzeitigem Überschuß an kalter Galaktose Inkubiert man BHK-Zellen in BME-Medium, welches gleichzeitig 1 mMol/l kalte Galaktose enthält, so läßt sich nach UDP- $^3\text{H}$ -Gal-Pulsen der gleiche Befund erheben wie bei BHK-Zellen, die in BME-Medium, welches nicht gleichzeitig einen Überschuß an kalter Galaktose enthielt, mit UDP- $^3\text{H}$ -Gal inkubiert wurden: es kann keine generelle Zellmarkierung beobachtet werden, wohl aber Zellen, die dem Zelltyp A und B entsprechen und auch hier um 10 SK/Zelle bzw. bis zu 50 SK/Zelle aufweisen.

Das heißt, daß in der BHK-Zellkultur die Typ A und Typ B Zellen eine Galaktoyltransferasenaktivität an ihrer Zellmembranoberfläche aufweisen müssen.

In Kulturen aus KAN-Zellen ist der Befund, der sich nach UDP- $^3\text{H}$ -Gal-Pulsen bei Inkubation der Zellen in gleichzeitig 1 mMol/l kalte Galaktose enthaltendem BME-Medium erheben läßt, von dem Befund, der nach Inkubation mit UDP- $^3\text{H}$ -Gal in normalem BME-Medium zu erheben ist, unterschieden:

es zeigt sich jetzt keine generelle Markierung mehr über konfluierenden Zellen (s.a. Abb. Nr. 23) .

Das heißt, daß die Markierung über konfluierenden Zellen offenbar auf der Verwertung von  $^3\text{H}$ -Galaktose beruht, welche den Zellen durch Hydrolyse von UDP- $^3\text{H}$ -Gal zur Verfügung steht.

Wie in KAN-Zellkulturen, die ohne gleichzeitigen Überschuß an kalter Galaktose mit UDP- $^3\text{H}$ -Galaktose inkubiert wurden, findet man aber auch hier markierte Zellen in der Zellkultur, die dem Typ A und B entsprechen. In diesen Zellen basiert die Markierung nach UDP- $^3\text{H}$ -Gal-Pulsen auf dem Vorhandensein einer oberflächengebundenen Galaktosyltransferasenaktivität (s.a. Tab. Nr. 5).

In den mit HSV-Lennette infizierten Kulturen aus BHK- und KAN-Zellen ändert sich der Befund im Vergleich zu den in BME-Medium ohne kalte Galaktose inkubierten Zellen bei Inkubation in gleichzeitig kalte Galaktose enthaltendem BME-Medium nicht.

Man beobachtet wiederum markierte Zellen des Typs A und B mit der entsprechenden Markierung, wobei auch jetzt die Zellen des Typs A wesentlich häufiger vorkommen als in den nicht infizierten Kulturen. Diese Typ A Zellen treten in den infizierten Kulturen etwa in einem Verhältnis von  $1 : z \times 10^1$  (mit  $z=1-9$ ) zu nicht markierten Zellen auf und zeigen z.T. auch hier eine wesentlich größer SK-Zahl/Zelle als in den nicht infizierten Kulturen. Angemerkt muß natürlich werden, daß sich diese infizierten Typ A Zellen durch die Infektion bezüglich ihres Erscheinungsbildes verändert haben: sie erscheinen abgekugelt und ein zusammenhängender Zellverband ist i.d.R. in den Zellkulturen nicht mehr zu beobachten. Deshalb kann auch keine Aussage mehr darüber gemacht werden, ob in den infizierten KAN-Zellen eine Hydrolyse exogener UDP- $^3\text{H}$ -Gal wie in den nicht infizierten abläuft, da in den mit HSV infizierten KAN-Kulturen keine konfluierenden Zellen mehr auftreten.

Dagegen kann festgestellt werden, daß -wie in den nicht infizierten Zellkulturen- die Markierung über den Zellen des Typs A und B, die nach Inkubation mit UDP-<sup>3</sup>H-Gal auftritt, durch eine auf den Zellen vorhandene Galaktosyltransferasenaktivität bedingt ist.

Die Infektion mit HSV-Lennette bewirkt aber, daß sich diese Transferasenaktivität in mehr Zellen einer BHK-Zellkultur nachweisen läßt.

#### IV.4. DISKUSSION

##### IV.4.1. DIE MARKIERUNG DURCH <sup>3</sup>H-GALAKTOSE IN INKUBATIONS-MEDIEN OHNE UND MIT ÜBERSCHUß AN KALTER GALAKTOSE

Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, stellt man eine wesentliche Verminderung der SK-Zahl/Zelle über BHK- und KAN-Zellen fest, wenn <sup>3</sup>H-Galaktose-Pulse einer Aktivität von 1 bzw. 2 uCi/ml in Inkubationsmedien, die 1 mMol/l 'kalte' nicht radioaktive Galaktose enthalten, durchgeführt werden statt in Inkubationsmedien, welche keinen gleichzeitigen Überschuß an kalter Galaktose aufweisen. Der relative Überschuß der kalten Galaktose verdrängt die 'heiße' radioaktiv strahlende <sup>3</sup>H-Galaktose weitgehend aus der zellulären Metabolisierung. Mit einer wesentlichen intrazellulären Verwertung exogener <sup>3</sup>H-Galaktose ist in solche Konzentrationen kalte Galaktose enthaltenden Inkubationsmedien nicht mehr zu rechnen.

Dies gilt auch für mit HSV-Lennette infizierte Zellkulturen. Auch Deppert et al (22) beobachten eine Reduzierung der Inkorporation von angebotener radioaktiver Galaktose bei Inkubation in Medien mit Überschuß an kalter Galaktose. Aber selbst bei 25-fachem Überschuß an kalter Galaktose (0.6 mMol/l) ist ein nur um 80 % verringerter Einbau der angebotenen radioaktiven Galaktose festzustellen, was auf ein ungesättigtes Transportsystem der Zellen für exogene

Galaktose zurückgeführt wird (22).

Trotz dieser Befunde, daß nämlich die zur Anwendung gekommene Konzentration an kalter Galaktose nicht ausreicht, um eine intrazelluläre Verwertung exogener  $^3\text{H}$ -Galaktose der angebotenen Konzentration vollkommen zu verhindern, zeigen die Ergebnisse, daß zumindest mit einer Verminderung der SK-Zahl/Zelle gerechnet werden kann, wenn eine nach  $\text{UDP-}^3\text{H}$ -Galaktose-Pulsen auftretende Markierung durch die Verwertung von durch Hydrolyse entstandener  $^3\text{H}$ -Galaktose verursacht wird und man in einem Medium inkubiert, welches gleichzeitig einen relativen Überschuß an kalter Galaktose enthält.

#### IV.4.2. DIE MARKIERUNG DURCH $\text{UDP-}^3\text{H}$ -GALAKTOSE IN INKUBATIONS-MEDIEN OHNE UND MIT ÜBERSCHUß AN KALTER GALAKTOSE

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß eine Hydrolyse von exogener  $\text{UDP-}^3\text{H}$ -Galaktose durch BHK-Zellen oder eine generelle Galaktosyltransferasenaktivität auf den Oberflächen dieser Zellen autoradiographisch nicht feststellbar ist. Eine allgemeine Zellmarkierung nach Inkubation mit  $\text{UDP-}^3\text{H}$ -Galaktose erfolgt nicht.

Es besteht insofern ein Widerspruch zu den Ergebnissen von Deppert et al (22), der gerade für BHK-Zellen eine Hydrolyse von exogener  $\text{UDP-}^3\text{H}$ -Galaktose mit nachfolgender intrazellulärer Verwertung der entstandenen  $^3\text{H}$ -Galaktose nachweisen kann.

Daß die angewandte Untersuchungsmethode und die zur Anwendung gekommenen Versuchsbedingungen aber grundsätzlich für den Nachweis einer Hydrolyse exogener  $\text{UDP-}^3\text{H}$ -Galaktose oder einer vorhandenen Galaktosyltransferasenaktivität tauglich sind zeigen die anderen Befunde in den mit  $\text{UDP-}^3\text{H}$ -Galaktose inkubierten KAN-Zellkulturen und BHK-Zellkulturen.

In der BHK-Kultur beobachtet man zwar keine generelle Zellmarkierung nach  $\text{UDP-}^3\text{H}$ -Galaktose-Pulsen, einzelne

Zellen sind aber in der Lage exogene UDP-<sup>3</sup>H-Galaktose so zu verwerten, daß eine Markierung der Zellen resultiert. Da sich auch bei Inkubation in 1 mMol/l kalte Galaktose enthaltendem Medium der gleiche Befund nach UDP-<sup>3</sup>H-Galaktose-Pulsen erheben läßt, müssen diese Zellen eine von außen zugängliche Galaktosyltransferasenaktivität aufweisen, die ihnen die Verwertung der angebotenen exogenen UDP-<sup>3</sup>H-Galaktose ermöglicht.

Man kann dabei zwei Zelltypen unterscheiden:

'Zelltyp A' : morphologisch unauffällige Zellen mit nur geringer Galaktosyltransferasenaktivität

'Zelltyp B' : morphologisch auffällige, wie 'sterbend' aussehende Zellen mit relativ hoher Galaktosyltransferasenaktivität

Dieser Befund steht nicht unbedingt im Widerspruch zu den Ergebnissen von Deppert et al (22) die keine von außen zugängliche Galaktosyltransferasenaktivität bei BHK-Zellen beobachten.

Denkbar ist z.B., daß die von Deppert et al (22) angewandte Untersuchungsmethode der UDP-Galaktose-Verwertung - nämlich die Messung der Inkorporation des radioaktiven Materials mit Hilfe des Szintillationszählers - die nur bei wenigen Zellen und nur in geringem Maße auftretende Galaktosyltransferasenaktivität nicht erfaßt. Vor allem, wenn man bedenkt, daß der mit geringer Galaktosyltransferasenaktivität ausgestattete Zelltyp A nur um 0.01 % und der mit etwas höherer Galaktosyltransferasenaktivität ausgestattete Zelltyp B um 0.1 % der Gesamtpopulation einer Zellkultur ausmachen, erscheint diese Möglichkeit wahrscheinlich. Hinzu kommt, daß die Häufigkeit des Zelltyps B sicher durch zusätzliche Einflüsse, wie angewandte Kulturmedien und Kulturbedingungen, beeinflusst wird, da diese Zellen offenbar 'sterbende' Zellen sind. Die größere Häufung dieses Zelltyps B bei Inkubation in BME-Medium ohne Glucose läßt dies vermuten.

Welche pathologischen Mechanismen dabei im einzelnen bei diesem Zelltyp B zu der dann von außen zugänglichen Galaktosyltransferasenaktivität führen bleibt offen. Möglicherweise spielen strukturelle Veränderungen der Zellmembran oder ein gesteigerter Ersatz durch Membranbruchstücke im Rahmen eines 'membran flow' mit Freisetzung von Galaktosyltransferasenaktivität dabei eine Rolle (s.d.a. 102)

Auch das nach UDP-<sup>3</sup>H-Galaktose-Pulsen, sowohl in Inkubationsmedien ohne und mit Überschuß an kalter Galaktose häufigere Auftreten von markierten Zellen in mit HSV-Lennette infizierten Zellkulturen aus BHK- und KAN-Zellen, kann als Hinweis gewertet werden, daß pathologische Mechanismen bei einem Teil der Zellen für das Auftreten einer von außen zugänglichen Galaktosyltransferasenaktivität verantwortlich sein können.

Für KAN-Zellen wurde gezeigt, daß die über konfluierenden Zellen nach UDP-<sup>3</sup>H-Galaktose-Pulsen auftretende Markierung auf der Hydrolyse der UDP-<sup>3</sup>H-Galaktose mit anschließender Verwertung der entstandenen <sup>3</sup>H-Galaktose beruht.

Inwieweit die Möglichkeit zur Hydrolyse dabei für konfluierende Zellen spezifisch ist bleibt offen.

Vielleicht ist die aus der Hydrolyse von UDP-<sup>3</sup>H-Galaktose resultierende <sup>3</sup>H-Galaktose-Konzentration pro Zelle so gering, daß die für eine Markierung notwendige <sup>3</sup>H-Galaktose-Konzentration nur über vielen, konfluierenden und nicht über einzeln liegenden Zellen erreicht werden kann.

Daneben fanden sich in der KAN-Zellkultur Zellen, die auch bei Inkubation in kalte Galaktose enthaltendem Medium nach UDP-<sup>3</sup>H-Galaktose-Pulsen eine Markierung zeigten.

Wie in der BHK-Kultur beobachtet man Typ A und Typ B Zellen, wobei der Zelltyp A in der KAN-Zellkultur wesentlich häufiger vorkommt als in der Kultur aus BHK-Zellen. Das heißt : ein großer Teil der KAN-Zellen besitzt eine

von außen zugängliche Galaktosyltransferasenaktivität, aber offensichtlich auch Enzyme, die exogene UDP-Galaktose degradieren können und zwar so, daß eine weitere Verwertung der entstandenen Produkte im Zellstoffwechsel möglich ist. In Verbindung mit den Ergebnissen von Patt (68), der bei Mäuse-Milz-Zellen keine, bei Balb c/3T3 Zellen und SV 40 transformierten 3T3 Zellen dagegen gerade eine von außen zugängliche Galaktosyltransferasenaktivität beobachten kann, deuten die in den vorliegenden Untersuchungen gewonnenen Befunde darauf hin, daß das Vorkommen einer Galaktosyltransferasenaktivität an von außen zugänglichen Stellen der Zellen von der Zellherkunft und/oder Zellart abhängt .

Daneben zeigen die Befunde, daß bei Studien über das Vorkommen von oberflächengebundenen Galaktosyltransferasen immer darauf geachtet werden sollte, daß keine Versuchsbedingungen entstehen, die zu pathologischen Zuständen der Zellen führen, da dann die Gefahr falsch positiver Ergebnisse zu befürchten ist.

Inwieweit dieser Effekt bei den Untersuchungen von Roth und White (84) und Roth et al (85) eine Rolle spielt kann nicht sicher beurteilt werden. Auffällig ist aber, daß in beiden Fällen Glucose-freie Inkubationsmedien bei den durchgeführten Transferase-Assays zur Anwendung kamen.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Wie die durchgeführten autoradiographischen Untersuchungen zeigen, erfolgt in mit HSV infizierten NMRI-Makrophagen p.i. eine autoradiographisch meßbare Reduplikation virusspezifischer DNA. Eine ausreichende Dauer der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Pulse spielt dabei eine wesentliche Rolle, da bei zu kurzen Pulsen die Synthese virusspezifischer DNA autoradiographisch nicht meßbar ist.

Eine Infektion mit HSV vom Stamm Lennette (Typ I) führt dabei in mehr Zellen einer Makrophagenpopulation zu der Produktion virusspezifischer DNA als die Infektion mit HSV vom Stamm D-316 (Typ II) .

Weiter war zu beobachten, daß in mit HSV infizierten Populationen aus alten (aus 12 Wochen alten Mäusen gewonnene) Makrophagen p.i. in mehr Zellen eine Reduplikation virusspezifischer DNA erfolgte als in mit HSV infizierten Populationen aus jungen (aus 4 Wochen alten Mäusen gewonnene) Makrophagen.

Nach der 7 Std. p.i. wurde eine Verminderung der RNA-Synthese in den mit HSV infizierten Makrophagenkulturen festgestellt.

In Makrophagen aus C57/bl-Mäusen war eine Synthese virusspezifischer DNA nach der Infektion mit HSV autoradiographisch nicht festzustellen.

Auch in aktivierten Makrophagen, die aus NMRI-Mäusen gewonnen werden, welche 72 Std. vor der Zellentnahme mit Thioglykollat vorbehandelt wurden, war nach einer Infektion mit HSV die Synthese virusspezifischer DNA zu beobachten, wobei auch hier eine Infektion mit HSV vom Stamm Lennette in mehr Zellen der infizierten Makrophagenpopulation die Synthese viraler DNA induzierte als eine Infektion mit HSV vom Stamm D-316 .

Insgesamt machte die Vorbehandlung mit Thioglykollat die Makrophagen für eine Infektion mit anschließender Re-duplikation herpessspezifischer DNA 'empfänglicher'; p.i. erfolgte in mehr Zellen einer Populationen aus aktivierten Makrophagen die Synthese virusspezifischer DNA im Vergleich zu Kulturen aus 'normalen' Makrophagen. Das 'Alter' der Makrophagen spielt nach einer Aktivierung keine wesentliche Rolle mehr.

Die RNA-Synthese war in den mit HSV infizierten Kulturen aus aktivierten Makrophagen p.i. nicht (bei Infektion mit HSV-Lennette) bzw. nur geringgradig (bei Infektion mit HSV-D-316) gegenüber nicht infizierten aktivierten Makrophagen verringert, selbst nicht nach der 7 Std. p.i. .

Bei den Untersuchungen über die Verwertung exogener UDP-<sup>3</sup>H-Galaktose durch BHK- und KAN-Zellen wurde beobachtet, daß nur wenige Zellen in den Kulturen eine von außen zugängliche Galaktosyltransferasenaktivität besitzen. Durch den Einfluß zellschädigender Mechanismen, wie zum Beispiel eine Infektion mit HSV oder auch Glucosemangel, erfolgt eine Vermehrung der Zellen mit von außen zugänglichen Galaktosyltransferaseaktivitäten in den Zellkulturen.

## VI. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Allison, A.C., Harrington, J.S., Birbeck, M. (1966):  
Cytotoxic effects of silica on makrophages  
J.of Exp.Med. 124 141-153
- 2) Allison, A.C., (1974): Interaction of antibodies, complement  
components and various cell types in immunity a. viruses  
Transplant.Rev. 19 3-55
- 3) Amlacher, E.: Autoradiographie in Histologie  
und Zytologie  
Gustav-Fischer-Verlag Stuttgart 1974
- 4) Antonie, F., Koteles, G.J., Hempel, K., Maurer, W. (1965):  
Über die Eignung verschiedener Fixationen und  
perchlorsäure haltiger Lösungen für autoradio-  
graphische Untersuchungen des RNS-, DNS- und Protein-  
stoffwechsels  
Histochemie 5 210ff.
- 5) Baserga, R., Malamud, D. (1969):  
Autoradiography (Techniques and application)  
in: Modern methods in experimental pathology  
Harper & Row Publishers, New York-Evanston-London 1969
- 6) Basten, A., Mitchell, J. (1976):  
Role of Macrophages in T Cell - B Cell Collaboration  
in: Nelson, D.: Immunobiology of the Macrophage Chapt. 3  
52ff. , Academic Press New York -San Francisco-London  
1976

- 7) Ben-Porat, T., Kaplan, S. (1973): Replication - Biochemical Aspects in: Kaplan, A.S.: The Herpes-viruses Chapt. 6 S.163ff.  
Academic Press New York-London 1973
- 8) Beyermann, K.: Chemie für Mediziner 275ff.  
Thieme-Verlag Stuttgart 1971
- 9) Bianco, C., Griffin, F.M., Siverstein, S.S. (1975): Studies of the macrophage complement receptor  
J. of Exp. Med. 141 1278-1290
- 10) Bittlingmaier, K., Schneider, D., Falke, D. (1975): Uptake of  $^3\text{H}$ -Thymidine and Cell DNA Synthesis during the early multiplikation phase of herpes-virus hominis in BHK-Cells  
Biochem. et Biophys. Acta 407 384-391
- 11) Blanden, R.V. (1970): Mechanisms of Recovery from a generalized viral infection: Mousepox  
J. Exp. Med. 132 1035-1054
- 12) Blanden, R.V., Hapel, A.J., Doherty, P.C., Zinkernagel, R.M.: Lymphocyte-Macrophage Interactions and Macrophage Activation in the Expression of Antimicrobial Immunity in Vivo  
in: Nelson, D.: Immunobiology of the Macrophage Chap. 15 367ff. Academic Press New York 1976
- 13) Blümcke, S., Backmann, R. (1966): Epon 812 als Einbettungsmittel für die lichtmikroskopische Autoradiographie  
Naturwissensch. 53 (1966) 362

- 14) Bonner, W.M., Lasekey, R.A. (1974):  
A Film Detection Method for Tritium-Labelled  
Proteins and Nucleic Acids in Polyacrylamide Gels  
Eur.J.Biochem. 46 (1974) 83-88
- 15) Boyd, G.A. (1955): Autoradiography in biology and  
medicine  
Academic Press Inc. New York 1955
- 16) Bryant, B.J. (1966):  
J.Cell.Biol. 29 , 29ff.  
z.n. Quelle 18) Chapt. 2 S.55
- 17) Chang, Y.T., Andersen, R.N. (1974):  
Studies on the long-term growth of macrophages  
obtained from various sources  
in: Wagner, H., Hahn, H., Evans, R.: Activation of  
Macrophages Chap.I 5ff.  
Excerpta Medica Amsterdam American Elsevier  
Publishing Co.Inc. New York 1974
- 18) Cleaver, J.E. (1967):  
Thymidine Metabolism and Cell Kinetics  
aus : Neuberger, A., Tatum, L.E.:  
Frontiers of Biology  
Band Nr. 6 North-Holland-Publishing Company Amsterdam
- 19) Darlington, R.W., Granoff, A. (1973):  
Replication-Biological Aspects  
in: Kaplan, A.S. The Herpesviruses Chapt. 4 S.94ff.  
Academic Press New York 1973

- 20) Davies, P., Allison, A.C. (1976):  
Secretion of Macrophage Enzymes in Relation to  
the Pathogenesis of Chronic Inflammation  
in: Nelson, D.: Immunobiology of the Macrophage  
Chap. 17 430ff.  
Academic Press New York 1976
- 21) Defendi, V. (1976):  
Macrophage Cell Lines and their Uses in Immunobiology  
in: Nelson, D.: Immunobiology of the Macrophage  
Chap. 11 276ff.  
Academic Press New York 1976
- 22) Deppert, W., Werchau, H., Walter, G. (1974):  
Differentiation between intracellular and cell  
surface glycosyl transferases. Galactosyl transferase  
activity in intact cells and in cell homogenate  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71 / 8 , 3068-3072
- 23) Drew, R.M., Painter, R.B. (1962):  
Radiation Res. 16 303ff.  
z.n. Quelle 18) Chapt. 3 pp. 98
- 24) Edelson, P.J., Zwiebel, R., Cohn, Z.A. (1975):  
The pinocytotic rate of activated macrophages  
The J. of Exp. Med. 142 (1975) 1150-1163
- 25) Epstein, L.B. (1976):  
The Ability of Macrophages to Augment in Vitro  
Mitogen- and Antigen-Stimulated Produktion of Interferon  
and other Mediators of Cellular Immunity by  
Lymphocytes in: Nelson, D.: Immunobiology of the  
Macrophage Chap. 8 202ff.  
Academic Press New York 1976

- 26) Evans, R., Alexander, P. (1972):  
Role of macrophages in tumour immunity  
Immunology 23 615ff.
- 27) Evans, W. H. (1974):  
Nucleotide pyrophosphatase, a sialoglycoprotein  
located on the hepatocyte surface  
Nature (London) 250 391-394
- 28) Eustatia, J. M., Maase, E., van Helden, P., van de Veen, J.  
(1972):  
Viral replication in mouse macrophages  
Arch. f. d. ges. Virusforschung 39 376-380
- 29) Fairbanks Jr., G., Levinthal, C., Ruder, R. H. (1965):  
Analysis of  $C^{14}$ -Labelled Proteins by Disc  
Elektrophoresis  
Biochemical and Biophysical Res. Comm. Vol 20  
No 4 (1965) 393ff.
- 30) Falke, D. (1964):  
Über die serologischen Beziehungen zwischen B- und  
Herpes simplex-Virus in der Komplementbindungs-  
reaktion  
H. f. Hyg 150 185-193
- 31) Falke, D. (1965):  
Untersuchungen über die Beziehungen zwischen  
Riesenzellbildung und Infektiosität von Herpes  
simplex Virus  
Arch. ges. Virusforschung 15 (1965) 387-401

- 32) Falke, D. (1967):  $\text{Ca}^{++}$ , Histidin und  $\text{Zn}^{++}$  als Faktoren bei der Riesenzellbildung durch Herpes-v. hominis  
Z. Med. Mikrobiol. Immunol. 153 (1967) 175-187
- 33) Falke, D. (1967):  
 $\text{Ca}^{++}$ , Histidin und  $\text{Zn}^{++}$  als Faktoren bei der Riesenzellbildung durch Herpesvirus hominis  
Z. M. M. I. 153 (1967) 175-187
- 34) Falke, D., Peterknecht, W. (1968):  
DNS-, RNS- und Proteinsynthese und ihre Relation zur Riesenzellbildung in vitro nach Infektion mit Herpesvirus hominis  
Arch. f. d. ges. Virusforschung 24 267-287
- 35) Fink, R. M., Fink, K. (1962):  
J. Biol. Chem. 237 2889ff.  
z. n. Quelle 18) Chapt. 2 S. 55
- 36) Fischer, H. A., Werner, G. (1971): Autoradiographie in: Arbeitsmethoden der modernen Naturwissenschaften  
De Gruyter Berlin 1971
- 37) Fishmann, M. (1969):  
Annu. Rev. Microbiol. 23 199-222  
z. n. Quelle: Nelson, D.: Immunobiology of the Macrophage  
Academic Press London New York San Francisco 1976
- 38) Frank, U., Schindling, B., Lindermann, J., Falke, D. (1978):  
Multiplication of Herpes simplex virus of type 1 and 2 in macrophages of NMRI and C 57/bl mice  
Acta virol. 22 193ff. 1978

- 39) Gedigk, P. (1974):  
Allgemeine Entzündungslehre  
in: Eder, M., Gedigk, P.: Lehrbuch der Allgemeinen  
Pathologie und der Pathologischen Anatomie 166ff.  
Springer Verlag Berlin Heidelberg 1974
- 40) Gordon, S., Cohn, Z. (1971):  
J. Exp. Med. 133 321ff.  
z.n. Quelle 94) S. 26
- 41) Grisham, J.W. (1964):  
Cellular proliferation in the liver  
in: Fry, R.J.M., Griem, M.L., Kirsten, W.H.:  
Normal and malignant Growth S. 28-43  
Berlin-Heidelberg-New York Springer Verlag
- 42) Grisham, J.W. (1969):  
Hepatocytic proliferation in normal rats after  
multiple exchange transfusions with blood from  
partially hepatectomized rats  
Cell Tissue Kinet. 2 277-282
- 43) Gude, W.D., Upton, C., Odell, T.T. (1955):  
Giemsa staining of autoradiograms prepared with  
stripping film  
Stain. Techn. 30 (1955) 161ff.
- 44) Hirsch, M.S., Zismann, B., Allison, A.C. (1970):  
Macrophages and age-dependent resistance to herpes  
simplex virus in mice  
The J. of Immunology 104 (1970) 1160-1165
- 45) Hirsch, J.G., Fedorko, M.E. (1970):  
Morphology of mouse mononuclear phagocytes  
in: van Furth: Mononuclear phagocytes Chap. 2  
Oxford Blackwell 1970

- 46) Johnson, R.T. (1964):  
The pathogenesis of herpes virus encephalitis II.  
A cellular basis of resistance with age  
J. Exp. Med. 120 359-374
- 47) Jones, T.C., Hirsch, J.G. (1970):  
The interaction in vitro of mycoplasma pulmonis  
with mouse peritoneal macrophages and L-cells  
J. Exp. Med. 133 231 ff. 1971
- 48) Johnson, E.D., Cole, G.A. (1975): Functional heterogeneity  
of Lymphocytic choriomeningitis virus-specific T-Lymphocytes  
J. Exp. Med. 141 (1975) 866-881
- 49) Just, J., Dundaroff, S., Falke, D. (1975):  
Biochemical classification of Herpes simplex  
virus typ 1 and 2 and of intermediate strains on  
the basis of different susceptibility of Thymidine-  
kinase to thymidine analogues  
Acta. Virol. 20 (1975) 31-39
- 50) Kaplan, A.S. (1969): Herpes simplex and Pseudorabies  
Viruses in: Gard, S., Hallauer, C., Meyer, K.F.: Virology  
Monographs Band 5  
Springer Verlag Wien
- 51) Keenan, T.W., Morre, D.J. (1975):  
Glycosyltransferases : do they exist on the surface  
membran of mammalian cells  
Febs letters 55 8 ff. 1975
- 52) Kelker, H. und andere (1971):  
Fischer lexikon Chemie 183ff.  
Fischer-Bücherei-GmbH 1971 Frankfurt/Main

- 53) Keller, R. (1976):  
Cytostatic and Cytocidal Effects of Activated  
Macrophages in: Nelson, D. Immunology of the  
Macrophage Chap. 19 487ff. Academic Press New York 1976
- 54) Knippers, R. (1971):  
Molekulare Genetik: Einführungen zur Molekular-  
biologie Band 2 S.236  
Thieme-Verlag stuttgart
- 55) Kodak: data release  
Kodak Technical Pamphlet No p-64  
United States of America 1976
- 56) Leblond, C.P., Kopriwa, B., Messier, B. (1969):  
Radioautography as a histochemical tool  
in: Histochemistry and Cytochemistry  
Symp. Publ. Div. 1  
Oxford London New York Paris Pergamon 1963
- 57) Lettre, H., Paweletz, N. (1966):  
Probleme der elektronenmikroskopischen Autoradio-  
graphie  
Naturwissen. 53 (1966) 268ff.
- 58) Lopez, C. (1975):  
Genetics of natural resistance to herpes virus  
infections in mice  
Nature 258 (1975) 152-153
- 59) Marsh, J.C., Perry, S. (1964):  
J. Clin. Invest. 43 267ff.  
z.n. Quelle 18) Chap. 2 S.54

- 60) Marsh, J.C., Perry, S. (1964):  
Arch. Biochem. Biophys. 104 116  
z.n. Quelle (18) Chap. 2 S.54-55
- 61) Mauel, J., Biroum-Noerjasin, Behin, R. (1974):  
Killing of intracellular parasites as a measure  
of macrophage activation  
in: Wagner, W.H., Hahn, H., Evans, R.: Activation of  
Macrophages Chap. 3 260ff.  
Excerpta Medica Amsterdam  
American Elsevier Publishing Co. Inc. New York
- 62) Mims, C.A. (1964):  
Aspects of the pathogenesis of virus diseases  
Bacteriological Reviews 28 (1964) 30-71
- 63) Mogensen, S. (1977):  
Role of Macrophages in Hepatitis Induced by  
Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 in Mice  
Infection and Immunity 15 (1977) 686-691
- 64) Munk, K., Sauer, G. (1965):  
Vermehrung und DNS-Synthese des Herpes-Simplex-  
Virus nach Mitomycin C-Behandlung  
Z. Naturforsch. 20 b 671-677
- 65) Nahmias, A.J., Dowelle, W.R. (1968):  
Antigenic and biologic differences in herpes virus  
hominis  
Progress in Med. Vir. 10 110-154
- 66) Nahmias, A.J., Roizman, B. (1973):  
Infection with Herpes Simplex Viruses 1 and 2  
New England Journal o. Med. 289 667-674, 719-725,  
781-789 (1973)

- 67) Neubert, D., Helge, H., and Bass: Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol. 1965 252 258ff.  
z.n. Quelle 87) Chap. 4 S. 78
- 68) Patt, L.M., Endres, R.O., Lucas, D., Grimes, W.J. (1976):  
Ectogalactosyltransferase studies in Fibroblasts  
and concanavalin A stimulated lymphocytes  
The J. of Cell Biology 68 799-802
- 69) Patt, L.M., Grimes, W.J. (1974):  
Cell surface glycolipid and glycoprotein glyco-  
syltransferases of normal and transformed cells  
J. Bio. Chem. 249 4257ff.
- 70) Pelc, S.R. (1967): Symp. Ges.  
Histochem. 12th, Gent, Belgium 1967  
z.n. Quelle 87) Chap. 4 S. 94
- 71) Pelc, S.R. (1968):  
Acta Histochem. Suppl. 8 41ff.  
z.n. Quelle 87) Chap. 4 S. 94
- 72) Perry, R.P. (1964): Quantitative autoradiography  
In: Methods in cell physiology. I. Bd., Prescott, D., M.,  
New York London Academic Press 1964 305
- 73) Perkins, E.H., Leonard, M.R. (1963): Specificity of Phago-  
cytosis as it may relate to Antibody Formation  
J. Immunol. 90 (1963) 228-237
- 74) Pierce, C.W., Kapp, J.A. (1976):  
The Role of Macrophages in Antibody Responses in  
Vitro in: Nelson, D.: Immunology of the Macrophage  
Chap. 1 13ff. Academic Press New York 1976

- 75) Plummer, G., Waner, J. L., Bowling, C. P. (1968):  
Comparative studies of type 1 and type 2 herpes  
simplex viruses  
British J. of Exp. Pathology 49 202-208 (1968)
- 76) Plummer, G., Waner, J. L., Phuangsab, A., Goodheart, C. R.  
(1970): Type 1 and type 2 herpes simplex viruses:  
serological and biological differences  
J. of Virology 5 51-59
- 77) Polliak, A., Gordon, S. (1975):  
scanning electron microscopy of murine macro-  
phages. Surface characteristics during maturation,  
activation and phagocytosis  
Laboratory Investigation 33 (1975) 469-477
- 78) Post, J., Hoffmann, J. (1964):  
Changes in the replication times and patterns  
of the liver cell during the life of the rat  
Expt. Cell. Res. 36 111-123
- 79) Potter, V. R. (1959):  
in Kinetics of cellular proliferation,  
Stohlmann, F. ed., Greene and Stratton, New York S. 104  
z.n. Quelle 18) Chap. 2 S. 56
- 80) Price, T. D., Hunds, H. A., Brown, R. J. (1963):  
J. Biol. Chem. 238 3111ff.  
z.n. Quelle 18) Chap. 2 S. 56
- 81) Pschyrembel, W.:  
Klinisches Wörterbuch 732  
De Gruyter Berlin New York 1972

- 82) Rogers,A.(1967):  
Techniques of Autoradiography  
Elsevier Publishing Comp. Amsterdam London  
New York 1967
- 83) Roizman,B.(1969): The Herpesviruses-A  
Biochemical Definition of the Group  
in: Arber,W.,Braun,W.et al: Current Topics in  
Microbiology and Immunology 49 1-65  
Springer Verlag Berlin
- 84) Roth,S.,White,D.(1972):  
Intercellular contact and cell-surface galactosyl-  
transferase activity  
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 69 /2 485-489
- 85) Roth,S.,Mc Guire,E.J.,Rosemann,S.(1971):  
Evidence for cell-surface glycosyltransferases  
The J. of Cell Biology 51 536ff.
- 86) Schindling,B.,(1979):Die Vermehrung von Herpes  
simplex Virus Typ I und Typ II in Makrophagen  
und die Pathogenese der intraperitonealen  
Herpesinfektion in NMRI- und C57/bl-Mäusen  
Dissertation Mainz 1979
- 87) Schultze,B.(1969):  
Autoradiography at the cellular level  
in: Pollister,A.W.: Physical Techniques in  
biological research Vol.3, Part B  
Academic Press New York London
- 88) Shur,B.D.,Roth,S.(1975):  
Cell surface glykosyltransferases  
Biochem. et Biophys. Acta 415 473-512

- 89) Siegert, R. J., Falke, D. (1966):  
Electron microscopical investigation of the development of herpes hominis virus in culture cells  
Arch. Ges. Virusforschung 19 230-249
- 90) Stevens, J. T., Cook, M. L. (1971):  
Restriction of Herpes simplex by Macrophages  
J. Exp. Med. 133 (1971) 19-37
- 91) Stewart, C. C., Lin, H. S., Adles, C. (1975):  
Proliferation and Colony-Forming ability of peritoneal exudate Cells in liquid Culture  
J. of Exp. Med. 141 (1975) 1114-1132
- 92) Stubbles, M., Kuhner, A. V., Glass, E. A., David, J. R.:  
Metabolic and functional studies on activated mouse macrophages  
J. Exp. Med. 137 537ff.
- 93) Territo, M., Cline, M. J. (1976):  
Macrophages and Their Disorders in Man  
in: Nelson, D.: Immunobiology of the Macrophage  
Chap. 23 593ff.  
Academic Press London New York San Francisco 1976
- 94) Tewari, R. P., Solotorovsky, M., Scherner, M. J. (1974):  
Macromolecular synthesis and phagocytosis of normal and fused macrophages  
in: Wagner, W.-H., Hahn, H., Evans, R.: Activation of macrophages Chap. 1 20ff.  
Excerpta Medica Amsterdam 1974

- 95) Unkeless, J.C., Gordon, S., Reich, E. (1974):  
Secretion of plasminogen activator by stimulated  
macrophages  
J. of Exp. Med. 139 (1974) 834-849
- 96) van Furth, R., Cohn, Z.A. (1968):  
The origin and kinetics of mononuclear phagocytes  
J. of Exp. Med. 128 (1968) 415-433
- 97) Wachsmuth, E.D. (1975):  
Aminopeptidase as a marker for macrophage  
differentiation  
Exp. Cell. Research 96 (1975) 409-412
- 98) Walker, W.S. (1976):  
Functional Heterogeneity of the Macrophage  
Chap. 4 99ff. Academic Press New York 1976
- 99) Whitmore, G.F., Gulyar, S. (1966):  
Science 151 691ff.  
z.n. Quelle 18) Chapt. 3 pp. 98
- 100) Wolfsberg (1964):  
Exptl. Cell Res. 35 119ff.  
z.n. Quelle 87) S.115
- 101) World Health Organization (1973):  
World Health Organ. Tech. Rep. Ser. 519
- 102) Zismann, B., Hirsch, M.S., Allison, A.C. (1971):  
Selective effects of antimacrophage serum, silica  
and antilymphocyte serum on pathogenesis of herpes  
virus infection of young adult mice  
J. of Immunology 107 (1971) 236-243

- 103) Frank, U., (1978):  
Der Einfluß von Dextransulfat 500 auf die Patho-  
genese der Herpeserkrankung bei NMRI-Mäusen  
Dissertation Mainz 1978

## Lebenslauf

Ich, Jürgen Lindermann, wurde am 21.8.1953 als Sohn des Amtsgerichtspräsidenten Dr. Lindermann und seiner Ehefrau Elfriede in Wiesbaden geboren.

Ab dem 28.4.1960 besuchte ich die Hebbelschule in Wiesbaden. Nach einem Umzug setzte ich meine Volksschulzeit in der Fritz-Gansberg-Schule ab dem 14.11.1961 fort. Im Frühjahr 1964 wechselte ich dann in die Sexta der Gutenbergschule in Wiesbaden. Dort legte ich mein Abitur im Frühjahr 1972 ab.

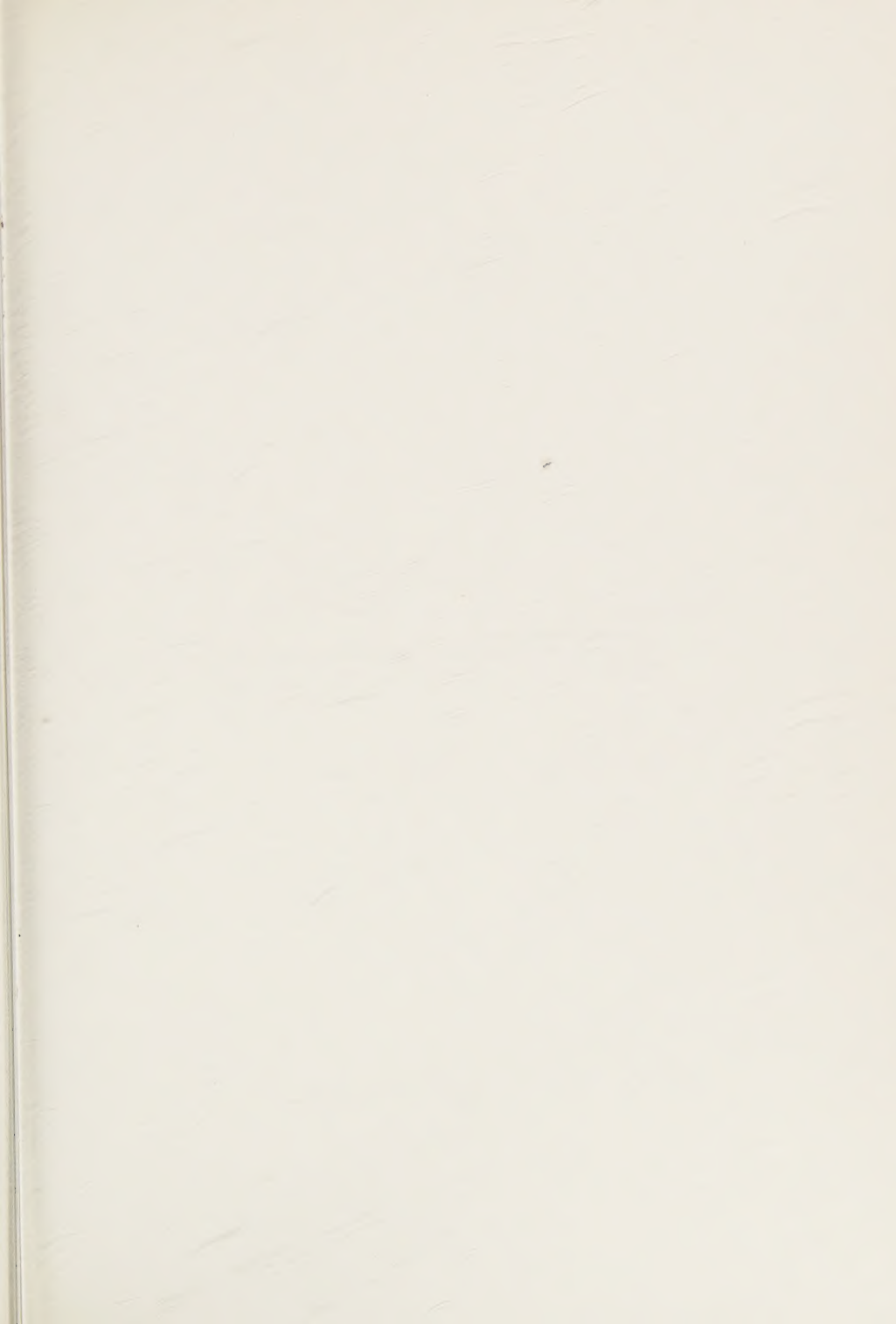
Im Oktober 1972 begann ich das Studium der Medizin in Marburg und legte dort nach 4 Semestern im Sommer 1974 die ärztliche Vorprüfung (Physikum) ab. Den klinischen Teil meines Studiums begann ich im Wintersemester 1974/75 in Mainz. Am 29.8.1975 legte ich in Mainz den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab. Im Herbst 1975 begann ich mit den experimentellen Arbeiten für meine Promotion unter Prof. Falke in der Abteilung Virologie des Mikrobiologischen Instituts der Universität Mainz.

Am 17.3.1978 legte ich dann den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab. Vom 17.4.1978 bis zum 16.3.1979 war ich im Rahmen meines praktischen Jahres an den Städtischen Kliniken Wiesbaden in den Fächern Innere Medizin, Chirurgie und Kinderheilkunde tätig.

Den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung habe ich am 7.5.1979 in Wiesbaden abgelegt. Am 18. Mai 1979 wurde mir die Approbation als Arzt erteilt.

Am 22.5.1979 habe ich mich mit Simone Herzfeld verheiratet.





Druck: Reinartz

**Copier- und Offset-Center**

Gaustraße 16, Telefon: 061 31/9 35 70 + Kirschgarten 3, Telefon 061 31/9 62 02  
6500 Mainz

